

Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Prof. Dr. med. Hansjürgen Raettig

Der direkte und indirekte Makrophagenmigrations-
hemmtest nach oraler und intraperitonealer Immu-
nisierung der Maus mit inaktivierten *S.typhimurium*-
Bakterien.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde an
den Medizinischen Fachbereichen der Freien
Universität Berlin

vorgelegt von
Otmar Seitz
aus Kuppenheim/Ra.

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533901_0001

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor : Prof.Dr.Med.Hansjürgen Raettig

Der direkte und indirekte Makrophagenmigrationshemmtest
nach oraler und intraperitonealer Immunisierung der Maus
mit inaktivierten *S.typhimurium*-Bakterien.



Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Otmar Seitz
aus Kuppenheim/Ra.

Referent : Prof.Dr.med.H.Raettig

Korreferent : Prof.Dr.med.D.Hartmann



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 29.12.1976

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einführung und Fragestellung	3
II. Material und Methoden	13
1. Versuchstiere	13
2. Antigen und Immunisierung	13
3. Kulturmedium	14
4. Glaswaren und Migrationskammer	15
5. Der Migrationshemmtest	16
6. Durchführung eines Versuchsansatzes	18
III. Versuchsverlauf und Versuchsergebnisse	23
IV. Diskussion	49
V. Zusammenfassung	59
VI. Literaturangaben	61

I. Einführung und Fragestellung.

Über die Wirksamkeit einer Impfmethode entscheidet letztlich die epidemiologische Erfahrung im Feldversuch mit allen Bedingungen der epidemiologischen Praxis. Für die Immunisierung auf oralem Wege konnte 1948 bei der Typhuspandemie in Mecklenburg (103,104) nicht nur die Überlegenheit der Wirkung im Vergleich zur parenteralen Immunisierung festgestellt werden, sondern unter praktischen epidemiologischen Bedingungen auch die bessere Eignung für den Katastrophenfall. Unter dem Eindruck dieser Erfahrung wurde an die Untersuchungen und Überlegungen zur oralen Immunisierung und zur lokalen allgemein, die seit den Versuchen Paul Ehrlichs im Jahre 1891 (42) entwickelt wurden und die vor allem mit dem Namen Besredka's verbunden sind (8,9,10,11), an - geknüpft und in Deutschland besonders von Raettig und Mitarbeitern die Erforschung der theoretischen Grundlagen der oralen Immunisierung vorangetrieben. Während schon vorher und in der Folgezeit weitere positive Erfahrungen in der Praxis gemacht wurden (44, 133,135) und neuere Berichte vorliegen (52,53,111,122, 130), befassten sich indessen experimentelle Forschungen zur Theorie sowohl mit der Wirksamkeit (105) oraler Immunisierung und dem Wirkungsmechanismus als auch den optimalen Impfstoffen (90,109), der optimalen Herstellung solcher Impfstoffe (68) und der Impfstoffanwendung (Dosis 107, Impfrhythmus, Art der Applikation 91,114,129). Sie führten vom Studium des Impferfolges im Mortalitätsversuch, wie ihn Raettig für die

S.typhimurium-Infektion (105) und Mochmann für die Dyspepsiecoli-Infektion (94) beschrieben, zur Messung zirkulierender Antikörper nach Immunisierung mit verschiedenen Antigenen (47,76,98,106,108), bei verschiedenen Tieren (75, 106,108,113) sowie bei der Primär - und Sekundärreaktion (71,72,108). Der Titer zirkulierender Antikörper konnte nicht als Maß für den Impfschutz befunden werden, wie das in den Anfängen der Immunologie angenommen worden war. Man fand, daß Tiere, die zur Zeit der Infektion keine Antikörper besaßen, dennoch einen hohen Immunitätsgrad gegen eine massive Infektion zeigten. Es ist vielmehr die schnelle Reaktionsbereitschaft immunkompetenter Zellen im Infektionsfall entscheidend (108). Den Untersuchungen über die systemische humorale Seite folgten Forschungen, welche die lokale humorale Aktivität bei lokaler Immunisierung (=Schleimhautimmunisierung) betrafen. Lokales, Antikörper produzierendes immunologisches Gewebe konnte zunächst mit dem Passiv-Kutan-Anaphylaxie-Test (PCA) (74,120), dann mit einem modifizierten Jerne-Test im Darm nachgewiesen werden (110,128,151), die Kinetik der Antikörperproduktion studiert (152,153), mit weiteren Verfahren lokalisiert und seine Zellen differenziert (110) werden. Mit diesem wichtigen Schritt wurde experimentell der Nachweis für die von Besredka theoretisch postulierte

(10,11) lokale Immunität erbracht, auf die er bei Beobachtungen der Milzbrandinfektion stieß. Außerdem war mit dem Nachweis immunkompetenter Zellen in der Lamina propria der Darmwand und deren quantitativem Anstieg nach oraler Immunisierung ein Maß gegeben für die Beurteilung der Impfantwort bei dieser Immunisierungsmethode (1,151). Die Frage wie es zur Antikörperbildung im gesamten Organismus kommt, zur lokalen wie zur generellen Immunantwort nach oraler bzw. nach lokaler Immunisierung überhaupt, wurde durch den "Kreislauf des Antigens" beantwortet, wodurch ein enger Kontakt zwischen dem Antigen und dem gesamten Immunapparat stattfindet. Aufbauend auf den Erkenntnissen von Herbst und Volkheimer (57,139,140,141,142) wurde die Antigenaufnahme untersucht, Persorption und Sekretion des Antigens nachgewiesen (59,92,123,127,136). Hinsichtlich der Frage der systemischen Immunität nach lokaler Immunisierung fanden Autoren eine Abhängigkeit von der zugeführten Antigendosis; große Antigenmengen stimulierten lokale systemische Immunität, kleinere Mengen induzierten nur lokale Immunität (13,132). Neben dem "Kreislauf des Antigens" wird eine andere mögliche Erklärung für die generelle Immunantwort nach lokaler Immunisierung hypothetisch diskutiert: Immunkompetente

Lymphozyten könnten lokal mit dem Antigen reagieren und von hier aus sich über den übrigen Immunapparat verbreiten (45).

Neben der Zunahme plaquebildender Zellen wurde die Immunozytadhärenz zur Beurteilung des Impferfolges herangezogen, die einen signifikanten Anstieg rosettenbildender Zellen in der Milz nach oraler Immunisierung erbrachte (134). Von den zellulären Phänomenen wurde außer der Immunozytadhärenz die Phagozytoseaktivität von Peritoneal- und Alveolarmakrophagen (67,131) untersucht; ein Anstieg der Phagozytoserate konnte nach spezifischer und unspezifischer oraler Immunisierung gemessen werden. Bei der vorliegenden Untersuchung stehen ebenfalls zelluläre Phänomene im Mittelpunkt. Während die Phagozytoserate jedoch den unspezifischen Schritt der Antigenaufnahme darstellt, soll bei der vorliegenden Arbeit die zellvermittelte Immunantwort geprüft und gemessen werden durch den Nachweis spezifisch reagibler Lymphozyten. Diese Thymus-abhängigen Lymphozyten sollen durch ihre spezifisch freigesetzten Produkte und deren Wirkung in einem einfachen invitro Test, dem Makrophagen-migrationshemmtest, nachgewiesen werden.

Die historische Entwicklung der zellulären Immunität stand lange Zeit im Zeichen der

Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ, für die die Tuberkulinreaktion das klassische Beispiel darstellt. Von großer Bedeutung für die Entwicklung der zellulären Immunität war die experimentelle Übertragung der Tuberkulinallergie von tuberkulinsensibilisierten Tieren auf normale Tiere durch Chase im Jahre 1945 (24). Als Allergietransferierende Zellen konnten Lymphozyten nachgewiesen werden (26, 154). Mackaness hat dann die Erkenntnisse zu diesem Themenkreis, welche unter dem Aspekt der Allergie standen, auf Probleme der antimikrobiellen Abwehr übertragen (80, 83, 86) und sich mit der erworbenen zellulären Resistenz gegen intrazelluläre Infektionen beschäftigt (81, 84, 87, 88), besonders der Listeriose. Diese hier stattfindenden zellulären Immunreaktionen, für die Thymus-abhängige Lymphozyten verantwortlich zu machen sind, spielen außer bei jenen fakultativ intrazellulären bakteriellen Infektionen wie *Listeria Monocytogenes*-, Mykobakterien-, Brucellen- und Pasteurelleninfektionen sowie bei der Infektabwehr von Pilz-, Protozoen- und Virusinfektionen eine bevorzugte Rolle bei der Abstoßung von Transplantaten, in der Tumorummunologie und bei Autoimmunerkrankungen (3, 7, 46, 77, 143). Lange hatte es jedoch für diese zellvermittelten Immunreaktionen keinen einfachen invitro Test gegeben, der der Titration

von spezifischen Antikörpern zur Messung der humoralen Immunität gleichgekommen wäre. Von George und Vaughan wurde ein solcher Test eingeführt, der Migrationshemmtest. George und Vaughan (49) untersuchten die Migration von Peritonealexsudatzellen von Meerschweinchen und fanden, daß die Migration Tuberkulin-sensibilisierter Tiere durch gereinigtes Proteinderivat von Tuberkulin behindert werden kann. Bereits Rich und Lewis berichteten 1932 (118), daß die Zellen von Milz- oder Knochenmarkkulturen Tuberkulin-sensibilisierter Tiere durch Tuberkulin in ihrer Migration behindert wurden. Die folgenden 25 Jahre in der Erforschung der Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ erschienen Publikationen über Stimulation wie Aktivitätsbehinderung von Zellen sensibilisierter Tiere in Gegenwart des Antigens (145). Auf der Suche nach einem invitro Korrelat der verzögerten Überempfindlichkeit bot sich an, solche Reaktionen zu untersuchen und zu messen. Mit dem von George und Vaughan dargestellten Migrationshemmtest und der weiteren Anwendung und Verbreitung der Methode durch David, J.R. und Mitarbeiter (33,34,35) und Bloom und Bennett (16,17,18,19) wurde ein Test eingeführt, mit dem es möglich ist, verzögerte Überempfindlichkeitsreaktionen zu messen und zu beurteilen, dabei vorkommende zelluläre

Interaktionen zu erforschen und allgemein die zellvermittelte Immunantwort zu prüfen. Er ist neben den Hauttesten und der Messung der Zytotoxizität stimulierter Lymphozyten das gebräuchlichste invitro Modell zur Untersuchung der zellulären Immunreaktion und hat bereits Eingang in die Klinik gefunden: Bei Allergien der Haut (Chrom, Nickel, Beryllium u.a.), bei Drogen- und Medikamentenallergie, bei autoallergischen Erkrankungen (Sjögren-Syndrom, Colitis ulcerosa, Glomerulonephritis u.a.), bei der Transplantatverwerfung (2,40,77) und in der Tumorummunologie (3,66, 143,157). Der MHT beruht auf dem Nachweis eines löslichen Faktors, dessen Wirkung - die Migrationsinhibition von Makrophagen des gleichen Tieres oder von Makrophagen eines anderen nicht sensibilisierten Tieres oder auch von Makrophagen einer anderen Spezies - im MHT zur Geltung kommt. Dieser lösliche Mediator ist einer von vielen, die verschiedene biologische Aktivitäten besitzen, die ohne Antikörpereigenschaften sind und die im Überstand von sensibilisierten Lymphozytenkulturen gefunden wurden (16,34), welche mit dem spezifischen Antigen inkubiert waren. Jene T-Lymphozyten, die für die zelluläre Immunantwort verantwortlich sind - thymektomierte Tiere zeigen keine zelluläre Immunität (32) - produzieren keine Antikörper, sondern

reagieren über ihre spezifisch konfigurierten Oberflächenrezeptoren direkt mit dem Antigen und leiten damit die zelluläre Immunreaktion ein. Nach Sensibilisierung proliferiert ein Teil der Lymphozyten, wenn sie mit dem Antigen zusammentreffen, ein anderer Teil produziert diese löslichen Faktoren, die man alle Lymphokine nannte (20,37). Das zuerst und am besten bekannte Lymphokin war der Migrationsinhibitionsfaktor (MIF), der im MHT nachgewiesen wird. Es handelt sich um einen nicht dialysierbaren, nicht speziesspezifischen, bei 56°/30 Min. thermostabilen Faktor, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 20 000 - 70 000 (69,70, 116,117,119,155). Der MIF wurde nur produziert von Tieren, die eine Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ zeigten. Nach Immunisierungen, die nur humorale Antikörper induzieren, zeigten die Lymphozyten dieser Tiere keine MIF - Bildung. Der MIF behindert die Makrophagenmigration ohne diese Zellen zu zerstören (19). Nicht alle Makrophagenpopulationen besitzen Rezeptoren für den MIF, z.B. zeigen Alveolarmakrophagen mit MIF - haltigen Kulturüberständen keine Migrationshemmung (73). Der MIF wirkt auf die Makrophagen so ein, daß sie ihren Stoffwechsel steigern, die Ausläufer vergrößern, sich auf diese Art in ihrer Wanderung behindern und so am Ort des Geschehens konzentriert werden. Die immunologisch

aktiven Zellen sind die Lymphozyten; die Makrophagen sind die Effektoren (16), die, von immunologisch kompetenten Lymphozyten dirigiert, ihre unspezifische Wirkung entfalten (54,87). Die Makrophagen sind im MHT also der unspezifische Indikator für den MIF. Es sei am Rande erwähnt, daß die Makrophagen noch andere wichtige Funktionen für die zelluläre Immunantwort ausüben (62, 89,97,100,101,137,144,150); sie sind nicht nur Effektoren der Immunantwort, sondern spielen bei Antigenaufnahme, Antigenverarbeitung und Antigenpräsentation eine wichtige Rolle und sind als akzessorische Zellen für die Funktion und Intaktheit der Lymphozyten von Bedeutung (101).

Die Spezifität der Migrationsinhibition wurde von David, J.R. u.a. nachgewiesen (4,33), wobei Amos und Lachmann durch die Verwendung Antigenfreier Überstände stimulierter Lymphozytenkulturen herausfanden, daß nicht nur die MIF-Bildung sondern auch dessen inhibitorische Wirkung an die Präsenz des entsprechenden Antigens gebunden ist (4). Jedoch können auch z.B. Phytohämagglutinin und Concanavalin A als unspezifische Mitogene T-Lymphozyten aktivieren und so die Mediatorenproduktion induzieren.

Weitere lösliche Mediatoren außer dem MIF sind ein Makrophagenaggregationsfaktor, ein Makrophagen akti-

-vierender Faktor (MAF), ein blastogener Faktor, ein mitogener Faktor, ein hautreaktiver Faktor, Interferon (Schutz gegen Virusinfektionen) und andere. Diese Mediatoren wirken teils auf Makrophagen, teils auf Lymphozyten, Granulozyten und andere Zellen. Eine Diskussion und Übersicht der Faktoren, die von Makrophagen oder Lymphozyten freigesetzt werden und die die Reaktionen anderer Zellen steuern und damit eine zentrale Stellung in der zellvermittelten Immunantwort einnehmen, findet sich bei Waksman und Namba (146).

Der MHT zur Messung zellulärer Immunität nach lokaler Immunisierung ist bisher fast ausschließlich im Zusammenhang mit der lokalen Immunisierung des Respirationstraktes beschrieben worden (23, 56, 65, 95, 96, 132, 147, 149). Bei der vorliegenden Untersuchung wird der MHT angewandt zur Identifizierung zellulärer Reaktionen nach oraler Immunisierung mit inaktivierten *S. typhimurium* Bakterien, vergleichend intraperitoneal und oral, mit dem direkten MHT und dem indirekten. Ziel der Arbeit ist es, auf diese Weise einen neuen Parameter zur Messung des Impferfolges nach oraler Immunisierung zu gewinnen.

II. Material und Methoden.

1. Versuchstiere.

Für die Versuche wurde weiße NMRI - (Naval Medical Research Institute) Mäuse aus der Zucht des Bundesgesundheitsamtes verwendet. Sie waren beiderlei Geschlechts und wogen zu Beginn der Versuche etwa 15-20 g. Die Versuchstiere wurden in Plastik Käfigen zu je 25 Tieren gehalten und erhielten Leitungswasser und Altromin zur Ernährung.

2. Antigen und Immunisierung.

Zur Immunisierung der Tiere wurden Salmonella-typhimurium-Bakterien vom Stamm L 6695 genommen. Die Bakterien wurden 24 Std. bei 37° C auf Agarplatten bebrütet, die Kultur anschließend mit phosphatgepufferter physiologischer NaCl - Lösung (ph = 7,2) abgeschwemmt. Nach dreiminütiger Inaktivierung bei 100° C wurde der Titer des Impfstoffes auf 3×10^9 Keime/ml eingestellt. Sterilitätsprüfungen wurden in Ansätzen von flüssigem Nährboden vorgenommen. Diese Suspension inaktivierter S. typhimurium-Bakterien fand sowohl zur Immunisierung der Tiere Anwendung als auch als Antigen zur Inkubation von Lymphozyten aus dem Peritonealexsudat sensibilisierter

Tiere im indirekten bzw. als Zusatz zum Kammermedium im direkten Migrationshemmtest. Jedes Tier der oralen Versuchsreihe wurde mit der Schlundsonde 10 Tage lang mit 0,25 ml der beschriebenen Suspension immunisiert und erhielt somit eine Gesamtdosis von $7,5 \times 10^9$ Keimen. Die parenteral immunisierten Tiere erhielten im Abstand von 10 Tagen zweimal 0,5 ml der S.typhimurium-Suspension, die auf eine Konzentration von 6×10^8 Keimen/ml verdünnt worden war, somit eine intraperitoneale Gesamtdosis von 6×10^8 Keimen pro Tier. Eine zehnfach höhere Dosis bei der oralen Immunisierung im Vergleich zur parenteral verabreichten Dosis ergab im Mortalitätsversuch einen gleich wirk-samen Impfschutz (105).

3. Kulturmedium.

Als Kultur- und Nährflüssigkeit sowohl zur Gewinnung des Peritonealexsudats wie auch als Medium für die Migrationskammern wurde bei allen Versuchen Eagle-Basal-Medium mit Zusatz von Earle's Salt und L-Glutamin verwendet. Die Trockensubstanz wurde von der Firma Mecron bezogen. Zur Herstellung einer Lösung, die mit Aq.bidest auf 100 ml aufgefüllt wurde, nahm ich 0,918 g Eagle-Medium, 0,2 g NaHCO_3 und 0,01 g Kanamycin. Außerdem wurden 15 % Neugeborenenkalbserum von Flow Laboratories und, wenn

das Medium zur Spülung der Bauchhöhle verwendet wurde, 4 E Heparin als weitere Zusätze hinzugefügt. Das Kulturmedium wurde mit Seitzfiltern sterilisiert und sein pH - Wert mit Natriumbicarbonat auf 7,4 eingestellt.

4. Glaswaren und Migrationskammer.

Die Glaswaren, die für den Migrationshemmtest benutzt wurden, waren nicht silikonisiert. Sie wurden im Wasserdruckstrahl und mit Aceton gespült, in Aquabidest mehrfach gewässert und danach 4 Std. bei 175° C sterilisiert. Die Kapillaren waren einschließlich Einfüllrohr 7,5 cm lang und hatten eine lichte Weite von 1,5 mm. Das Kapillarende wurde vor Füllung der Kapillare zugeschmolzen. Die zu zentrifugierende Zellsuspension wurde durch wiederholtes Beklopfen des Kapillarstückes bis in das Ende der Kapillare gebracht.

Als Migrationskammer wird von den meisten Autoren die von Mackaness entwickelte Kammer (79) benutzt oder ähnliche (21). Bei der hier durchgeführten Versuchsreihe fanden Gewebekulturdosen aus Plastik der Firma Falcon (Falcon plastic tissue culture dish) Anwendung. Auf dem Boden der Dose wurden mit einer Spritze mehrere Silikonwachsstreifen übereinander gelagert, die die kreisförmig angeordneten Kapillarstücke überzogen und einschlossen. Nach Füllung

der auf diese Weise entstandenen Kammer mit Kulturmedium - mit bzw. ohne Antigen - wurde ein Deckglas aufgesetzt; zuvor war 5 % CO₂ enthaltende Luft über die ganze Gewebekulturdose geleitet worden. Auf dem Boden der Falcon - Gewebekulturdose konnten so mindestens 4 Kammern angefertigt werden, d.h. 2 Versuchsansätze mit beliebig vielen Kapillarstücken - pro Ansatz 2 Kammern, eine mit und eine ohne Antigen im Medium (direkter MHT), bzw. eine mit Überstand von Antigen - inkubierten Lymphozyten und eine mit Überstand von nicht Antigen - inkubierten Lymphozyten (indirekter MHT).

5. Der Migrationshemmtest.

Der bei dieser Untersuchung angewandte Migrationshemmtest hält sich im Wesentlichen an den von George und Vaughan beschriebenen und von David, J.R. und Mitarbeitern verbreiteten MHT (33,49). Andere Techniken (Agarose - Tropftechnik, direkter MHT mit heterologen Zellen, Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitätstest) sind beschrieben worden (25,55,63,102,115). Der MHT kann zur Identifizierung von Antigenen angewandt werden (21,99) oder zur Erkennung von sensibilisierten Zellen, wie dies hier unternommen wird. Dabei kann man prinzipiell zwei Methoden unterscheiden, der direkte und der indirekte MHT.

Direkter MHT : Lymphozyten - und Makrophagen-haltiges Peritonealexsudat eines sensibilisierten Tieres wird dem homologen Antigen ausgesetzt. Die Lymphozyten können direkt, "an Ort und Stelle", ihre Wirkung zeigen über die Freisetzung des Inhibitionfaktors; es handelt sich also um eine direkte Interaktion von Lymphozyten, Makrophagen und Antigen. MIF - Produktion und MIF - Wirkung erfolgen nebeneinander. Statt der Lymphozyten aus dem Peritonealexsudat können auch Lymphozyten anderer Organe verwendet werden, wobei man dann das Makrophagen enthaltende Peritonealexsudat eines nicht sensibilisierten Tieres als Indikatorsystem hinzuzieht.

Indirekter MHT : Die Bildung des Inhibitionfaktors wird zunächst induziert durch die Inkubation der Lymphozyten eines sensibilisierten Tieres mit dem entsprechenden Antigen. Der zellfreie Überstand dieser so behandelten Lymphozytenkultur mit dem darin enthaltenen MIF wird als Kulturmedium für die Makrophagen nicht sensibilisierter Tiere genommen. MIF - Wirkung und MIF - Produktion sind getrennt. Bei der unternommenen Versuchsreihe wurde zunächst die einfache Methode des direkten Migrationshemmtestes durchgeführt ohne den differenzierenden Vergleich zwischen den einzelnen Lokalisationen der Lymphozytenreservoirs (lokal, systemisch). Vielmehr diente zum Test auf die Anwesenheit

sensibilisierter Zellen einfach das Peritonealexsudat als Reservoir für die erforderlichen Zellen, die darin zu einem Anteil von etwa 60 % (Makrophagen) bzw. 30 % (Lymphozyten) enthalten sind; die zu der Lymphozyten-Makrophagen-Antigen-Interaktion erforderliche Lymphozytenmenge ist erstaunlich gering verglichen mit der Zahl der beteiligten Effektorenzellen; sehr geringe Mengen sensibilisierter Lymphozyten können bereits die antigenspezifische Hemmung auslösen. Im Anschluß an den direkten MHT wurde der indirekte MHT jenem gegenübergestellt. Aus der vergleichenden Durchführung sollte eventuell die Wirkung eines verbesserten Antigen - Lymphozytenkontakts zu sehen sein, der bei der nicht löslichen Art des Antigens von Bedeutung sein könnte.

6. Durchführung eines Versuchsansatzes.

3 Tage vor Gewinnung des Peritonealexsudats erhielten die Versuchstiere 0,5 ml auf 37° C vorgewärmtes inkomplettes Freund'sches Adjuvans (Difco Laboratories) intraperitoneal, um eine höhere Zellausbeute zu erreichen. Zur Gewinnung des Exsudats wurde das Tier ausgeblutet, das Fell der Bauchseite abgezogen, die Bauchdecke mit sechsprozentigem Alkohol desinfiziert und 3 ml des

beschriebenen Mediums mit 4 E Heparinzusatz in die Bauchhöhle zur Spülung injiziert. Die Ausblutung erfolgte, um eine Erythrozytenkontamination zu vermeiden, die ein verändertes Migrationsverhalten der Makrophagen zur Folge haben kann; aus demselben Grund wurde darauf geachtet, daß die Bauchdecken nicht verletzt wurden bzw. bei der Injektion des Mediums keine Gefäße angestochen wurden. Das Abdomen wurde leicht massiert und anschließend das Exsudat abgezogen, das im Schnitt etwa 1×10^6 Zellen pro ml enthielt. Die gewonnene Zellsuspension wurde zweimal gewaschen durch Zentrifugieren (5 Min., 800 rpm, bei 4° C), Abziehen des Überstandes und Resuspendieren im Medium. Die zuletzt gewonnene Zellsuspension wurde auf mindestens 4 der Kapillarrohre verteilt und 10 Min. bei 600 rpm und 4° C zentrifugiert. Die Suspension sollte nicht zu stark zentrifugiert werden, damit die Zellen nicht nach Durchtrennen der Kapillare gewissermaßen aus der Kapillare herausschießen, wodurch die Messung der Wanderungsfläche ungenauer wird. Exakt an der Flüssigkeit - Zellgrenze oder eher etwas im Zellbereich wird die Kapillare durchtrennt, um hier das Ergebnis nicht etwa dadurch zu verfälschen, daß eine scheinbare Hemmung durch eine Wanderung innerhalb der Kapillare entsteht. Die ca. 1,5 cm langen kapillarstücke wurden in der oben

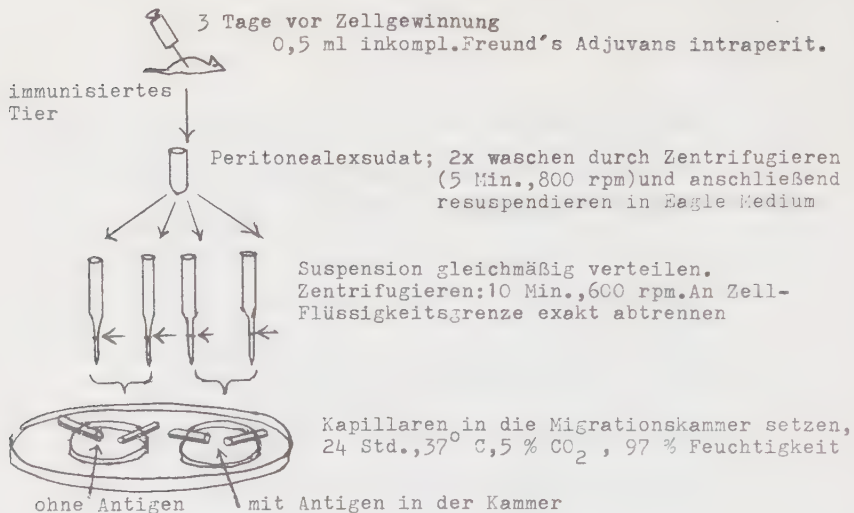
beschriebenen Weise für einen Versuch angesetzt. In eine Migrationskammer wurde 1 ml Medium gebracht, in die Kammer mit Antigen 0,5 ml Medium und 0,5 ml der inaktivierten *S. typhimurium* - Suspension, die zuvor auf ein Zehntel (= 3×10^8 Keime/ml) verdünnt worden war; d.h. eine Keimmenge von 15×10^7 wurde der Kammer beigegeben. Im Eosinvitalitätstest vor und nach einer 24 stündigen Inkubation im Reagensglas, wie sie beim indirekten MHT durchgeführt wird und weiter unten beschrieben ist, konnte keine nennenswerte Zunahme der Eosinfärbbarkeit der Peritonealzellen durch die *S. typhimurium* - Keime bei dieser Keimmenge festgestellt werden. Diese Dosis des Antigens konnte somit als nicht toxisch angesehen werden. Von den Falcon - Gewebekulturdosen mit je 4 Kammern darin wurden mehrere in eine große feuchte Kammer gebracht und diese 24 Std. bei 37° C im Brutschrank aufbewahrt.

Beim indirekten MHT wird die aus der Bauchhöhle abgezogene Suspension im Gegensatz zum bisherigen Vorgehen, das im Wesentlichen für den direkten MHT geltend ist, nach der Waschung nicht auf die Kapillarrohre verteilt, sondern im sterilen Reagensglas mit dem Antigen über 24 Std. inkubiert bei 37° C, feuchter Atmosphäre und 5 % CO_2 . Die Zellzahl wurde

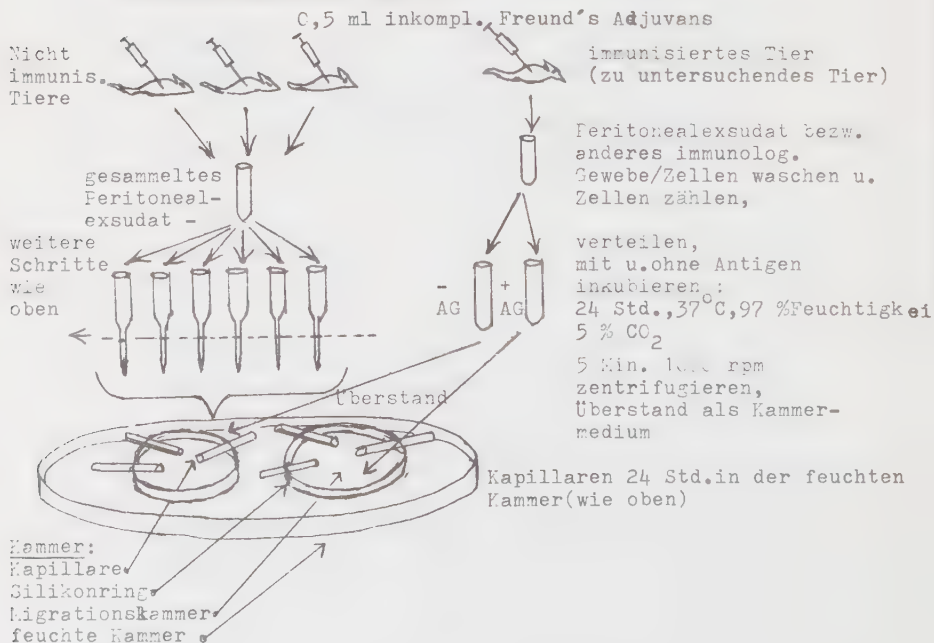
zuvor auf eine Konzentration von ca. 2×10^6 Zellen/ml eingestellt, um einigermaßen konstante Bedingungen für die MIF - Bildung zu erreichen. Zu 2 ml Zellsuspension wurde 0,5 ml der inaktivierten *S. typhimurium* - Suspension gegeben (3×10^8 Keime/ml), d.h. 15×10^7 Keime. Nach 24 Stunden wurde die Suspension zentrifugiert bei 1000 rpm, 5 Min. und der Überstand als Kammermedium benutzt, nachdem sein pH - Wert zuvor erneut kontrolliert und auf einen Wert von 7,4 eingestellt worden war. Zum Überstand wurde ein Drittel normales Medium in die Kammer zugegeben. Als "Testmakrophagen" wurden Makrophagen des Peritonealexsudats normaler, nicht immunisierter Tiere genommen, wobei die Exsudate mehrerer Tiere gesammelt wurden, um beliebig viele Kapillaren damit füllen zu können; pro Kammer wurden durchschnittlich 4 Kapillaren angesetzt.

1.) Schema des direkten MHT.

- 22 -



2.) Schema des indirekten MHT.



III. Versuchsverlauf und Ergebnisse.

Insgesamt wurden 100 Ansätze unternommen, die sich folgendermaßen aufgliedern : 3 Tage nach Ende der Immunisierungsperiode wurden im direkten MHT 10 Ansätze oral immunisierter Tiere, 10 Ansätze parenteral immunisierter Tiere und 10 Kontrollen ausgeführt. Die gleiche Ansatzreihe wurde für den indirekten MHT unternommen. 14 Tage nach Ende der Immunisierungsperiode wurden wieder 10 Ansätze für oral, 10 Ansätze für parenteral immunisierte Tiere vorgenommen, wiederum erst mit dem direkten, dann mit dem indirekten MHT. 20 Tiere einer Immunisierungsart wurden also 3 Tage nach Ende der Immunisierungsperiode und 20 Tiere 14 Tage nach Immunisierungsende auf die Bildung des Inhibitionsfaktors kontrolliert. Die Ansätze der nicht immunisierten Tiere wurden durchgeführt, um zu prüfen, ob das Antigen im Medium unabhängig von der Anwesenheit sensibilisierter Zellen einen unspezifischen Einfluß auf die Makrophagenmigration auszuüben vermag. Bei der Berechnung des Migrationsindex sind jedoch nicht diese Kontrollen der Bezugspunkt; diese werden vielmehr zum Vergleich der Migrationsindizes verschiedener Versuchsreihen herangezogen.

Zur Berechnung der einzelnen Migrationsindices kann als Bezug nur die Migration der Ansätze ohne Antigen aus demselben Exsudat verwendet werden, die mit der Migration mit Antigen verglichen wird :

$$\text{Migrationsindex (MI) in \%} = \frac{\text{Fläche der Migrat.mit AG}}{\text{Fläche der Migrat.ohne AG}}$$

bezw.Migrationsinhibition (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{Migrat.fläche mit AG}}{\text{Migrat.fläche ohne AG}} \right) \times 100$$

Die Migrationsfläche der einzelnen Kammer wurde als durchschnittliche Migrationen der in der Kammer befindlichen Kapillarstücke ermittelt.

Von allen Migrationsindices einer Versuchsreihe wurde ein Durchschnittsmigrationsindex (dM) notiert. Diese durchschnittlichen Migrationsindices aller Versuchsreihen wurden verglichen. Um genauere Aussagen machen zu können über das Zustandekommen der Durchschnittsindices, wurde die Streuung der Einzelwerte graphisch dargestellt. In weiteren Diagrammen wurden die Inhibitionsprozente eingetragen. Zur Auswertung der Migrationen wurden die Kammern unter dem Mikroskop auf ein Koordinatensystem gelegt, die Migrationsflächen planimetriert durch Messen der Anzahl der Überwanderten

Quadrate und außerdem photographiert. Andere Möglichkeiten der Auswertung : Die Projektion der Flächen, das Abzeichnen und anschließende Planimetrieren, die Planimetrierung mit einem Okularplanimeter (20 x 20) unter dem Lupenmikroskop und das Wiegen der auf Pergament projizierten und anschließend ausgeschnittenen Areale.

Übersicht über die Ergebnisse des MHT nach oraler und intraperitonealer Immunisierung mit *S.typhimurium* :

I.1. Migrationsindices,direkter MHT,3-Tage-Wert.

I.2. Migrationsinhibition in %,dir.MHT,3-Tage-Wert

I.3. Migrationsindices,indirekter MHT,3-Tage-Wert.

I.4. Migrationsinhibition in %,indir.MHT,3-Tage-Wert.

II.1. Migrationsindices,direkter MHT,14-Tage-Wert.

II.2. Migrationsinhibition in %,dir.MHT,14-Tage-Wert.

II.3. Migrationsindices,indirekter MHT,14-Tage-Wert.

II.4. Migrationsinhibition in %,indir.MHT,14-Tage-Wert.

III. Migrationsindices der oralen und intraperi-

tonealen Immunisierungsreihe - eine vergleichende
Gegenüberstellung des direkten u.indirekten MHT,
der 3-Tage-Werte und 14-Tage-Werte.

III.1.Indices der oralen Reihe.

III.2.Indices der intraperitonealen Reihe.

IV. Übersicht über die durchschnittlichen Migrations-
indices einschließlich der Streuung für den
direkten und indirekten MHT,3 bzw. 14 Tage nach
Immunisierungsende.

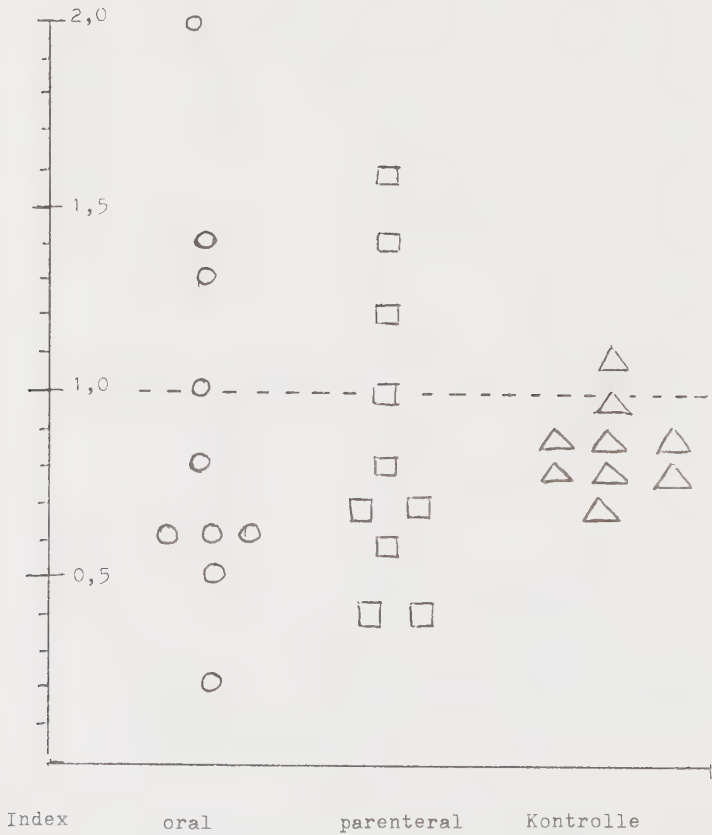
I.1. Die Migrationsindizes des direkten MHT 3 Tage
nach Immunisierungsende mit *S. typhimurium*.

Versuch	oral	parenteral	Kontrolle
1	0,6	1,6	1,1
2	0,2	1,2	0,8
3	1,4	0,4	0,9
4	0,5	0,7	0,8
5	0,8	0,6	0,8
6	2,0	1,0	1,0
7	0,6	0,8	0,7
8	1,0	1,4	0,9
9	0,6	0,4	0,8
10	1,3	0,7	0,9
dM	0,90	0,88	0,87

dM = durchschnittlicher Migrationsindex

Die Verteilung der Migrationsindices,
direkter MHT, 3-Tage-Wert.

Graphische Darstellung zu I.1.



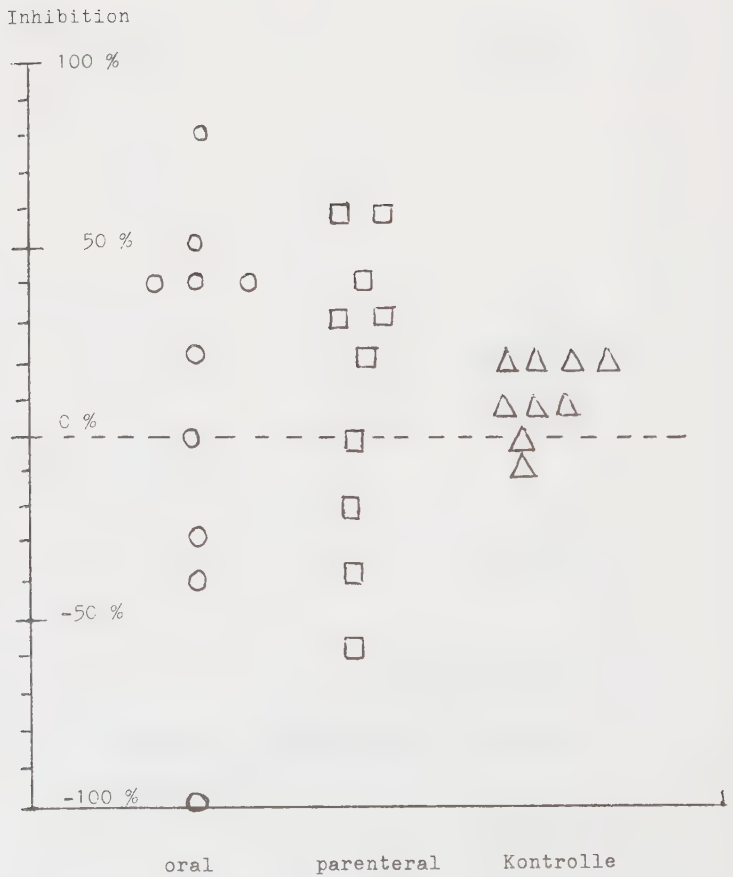
I.2. Migrationsinhibition in % für den direkten
MHT 3 Tage nach Immunisierungsende mit
S.typhimurium.

Versuch	oral	parenteral	Kontrolle
1	40	-60	-10
2	80	-20	20
3	-40	60	10
4	50	30	20
5	20	40	20
6	-100	0	0
7	40	20	30
8	0	-40	10
9	40	60	20
10	-30	30	10
dMI	10	12	13

dMI = durchschnittliche Migrationsinhibition (%)

Verteilung der Migrationsinhibitionen, direkter MHT
3-Tage-Wert.

Graphische Darstellung zu I.2.



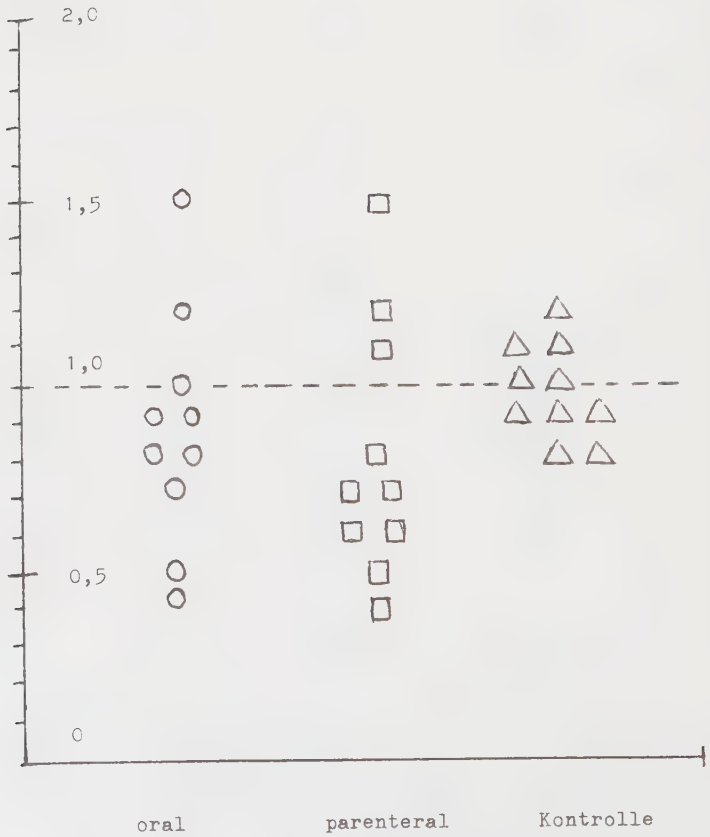
I.3. Migrationsindices des indirekten MHT 3 Tage
nach Immunisierungsende mit S.typhimurium.

Versuch	oral	parenteral	Kontrolle
11	1,0	1,1	1,0
12	0,8	0,6	1,1
13	0,4	0,7	0,8
14	0,8	0,6	0,8
15	1,2	0,8	1,1
16	0,7	1,2	0,9
17	0,9	0,4	0,9
18	0,9	0,5	1,0
19	0,5	1,5	0,9
20	1,5	0,7	1,2
dM	0,87	0,81	0,97

Die Verteilung der Migrationsindices,
indirekter MHT,3-Tage-Wert.

Graphische Darstellung zu I.3.

Index



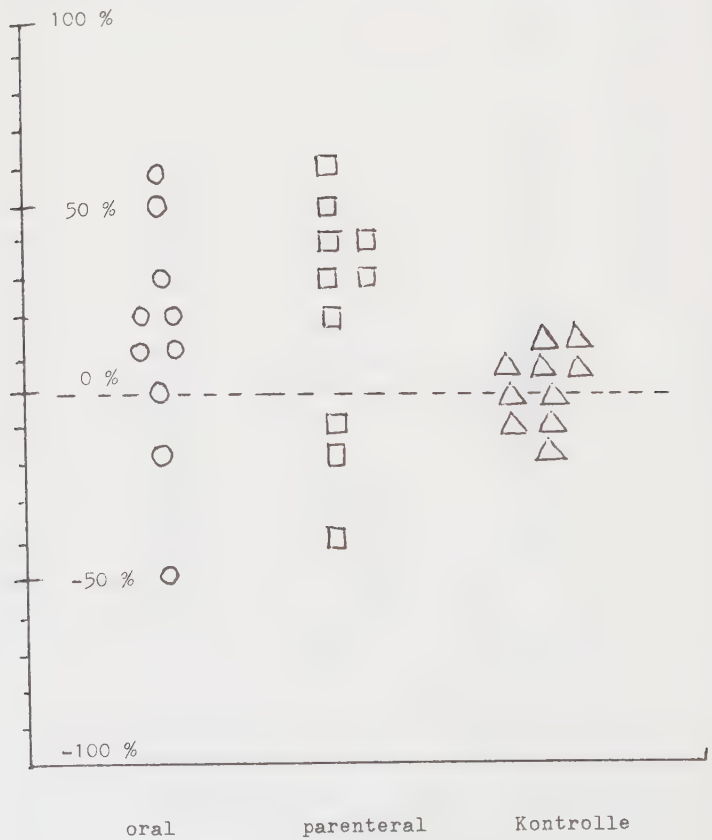
I.4. Migrationsinhibition in % für den indirekten MHT
3 Tage nach Immunisierungsende mit *S.typhimurium*.

Versuch	oral	parenteral	Kontrolle
11	0	-10	0
12	20	40	-10
13	60	30	20
14	20	40	20
15	-20	20	-10
16	30	-20	10
17	10	60	10
18	10	50	0
19	50	-40	10
20	-50	30	-20
dMI	13	19	3

Die Verteilung der Migrationsinhibitionen,
indirekter MHT, 3-Tage-Wert.

Graphische Darstellung zu I.4.

Inhibition



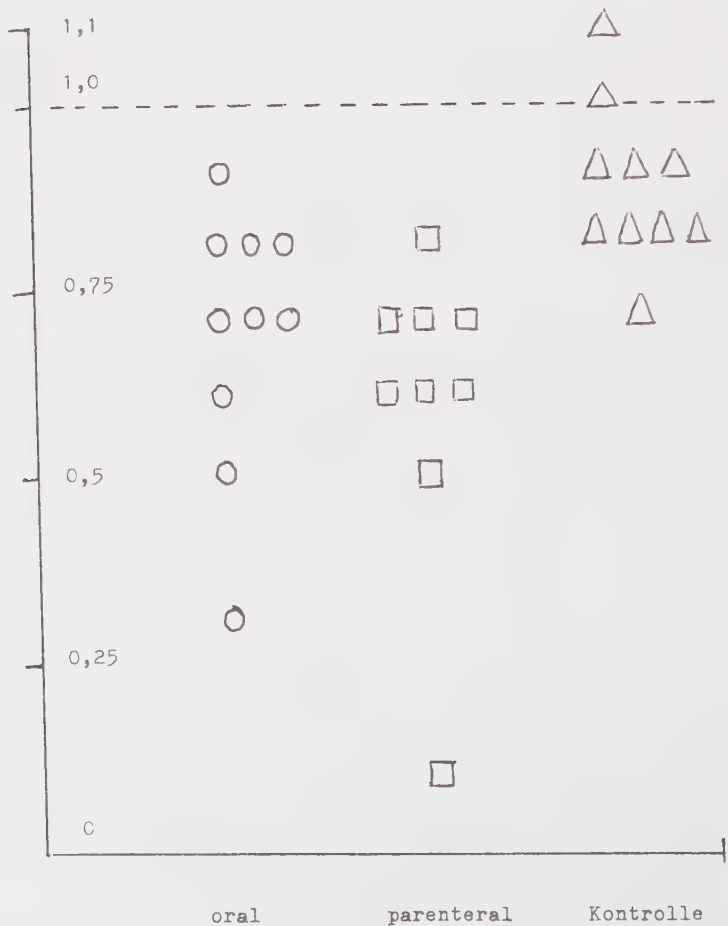
II.1. Migrationsindices des direkten MHT 14 Tage
nach Immunisierungsende mit S.typhimurium.

Versuch	oral	parenteral	Kontrolle
21	0,8	0,7	
22	0,8	0,7	
23	0,3	0,5	vgl.
24	0,9	0,4	Werte
25	0,7	0,1	nach
26	0,7	0,6	3 Tagen
27	0,5	0,6	
28	0,8	0,7	
29	0,6	0,6	
30	0,7	0,8	
dM	0,68	0,57	0,87

Die Verteilung der Migrationsindices,
direkter MHT, 14-Tage-Wert.

Graphische Darstellung zu II.1.

Index

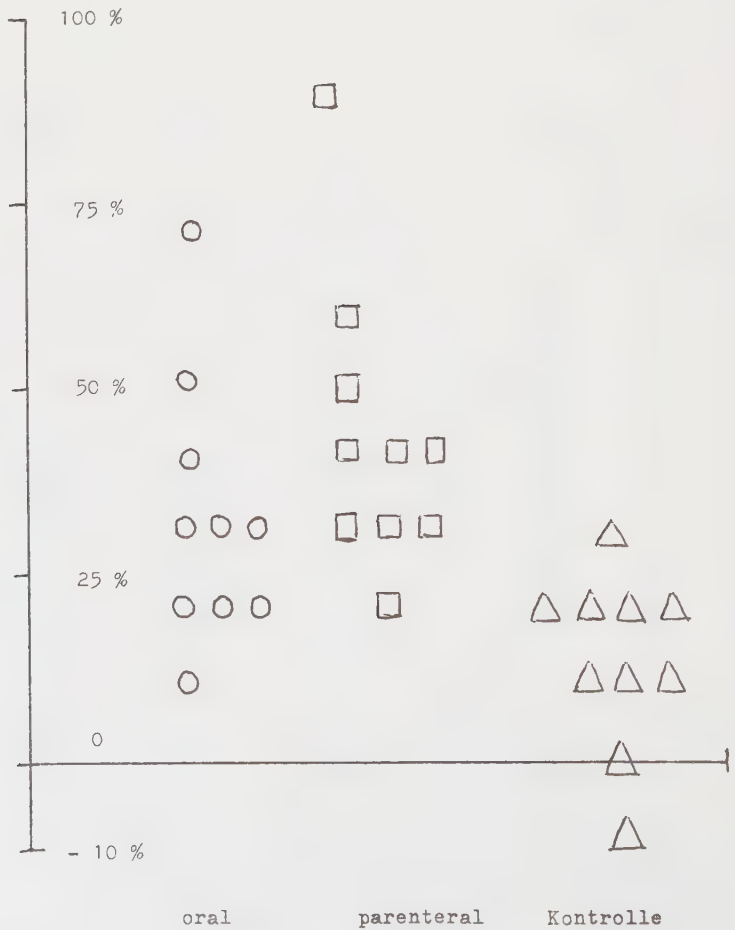


II.2. Migrationsinhibition in % für den direkten MHT
14 Tage nach Immunisierungsende mit *S.typhi-*
muurium.

Versuch	oral	parenteral	Kontrolle
21	20	30	
22	20	30	
23	70	50	
24	10	60	
25	30	90	vgl.
26	30	40	Werte
27	50	40	nach
28	20	30	3 Tagen
29	40	40	
30	30	20	
dMI	32	43	13

Die Verteilung der Migrationsinhibitionen,
direkter MHT, 14-Tage-Wert.

Inhibitionen

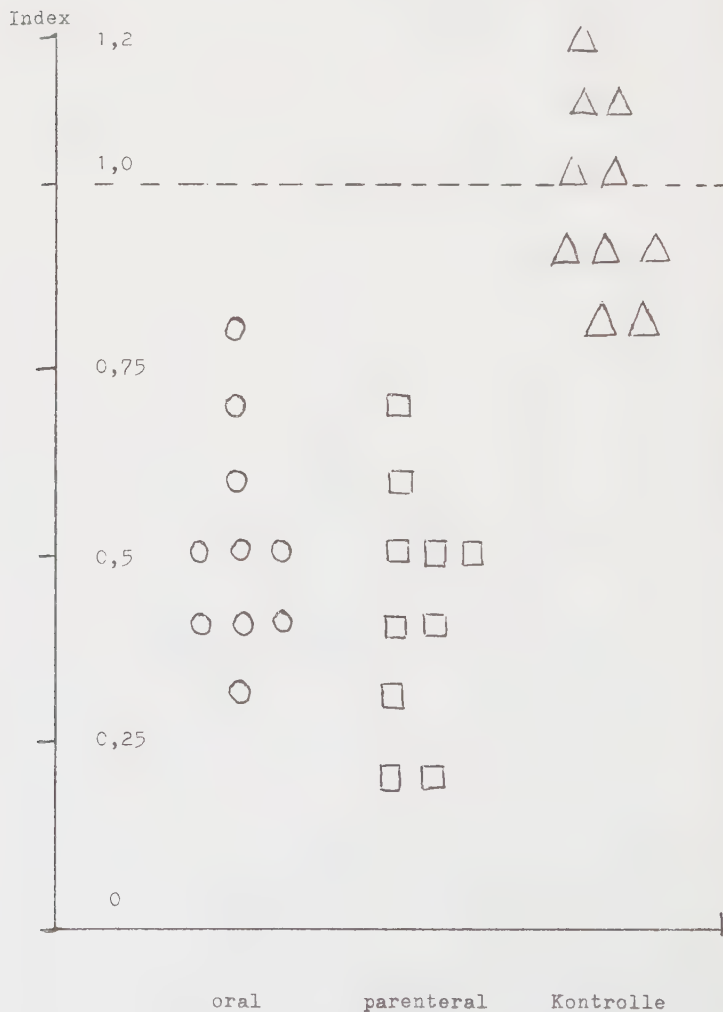


II.3. Migrationsindices des indirekten MHT 14 Tage
nach Immunisierungsende mit S.typhimurium.

Versuch	oral	parenteral	Kontrolle
31	0,4	0,3	
32	0,3	0,5	
33	0,4	0,7	
34	0,8	0,5	
35	0,5	0,6	vgl.
36	0,4	0,2	Werte
37	0,7	0,4	nach
38	0,5	0,4	3 Tagen
39	0,6	0,2	
40	0,5	0,5	
dM	0,51	0,43	0,97

Die Verteilung der Migrationsindices,
indirekter MHT, 14-Tage-Wert.

Graphische Darstellung zu II.3.



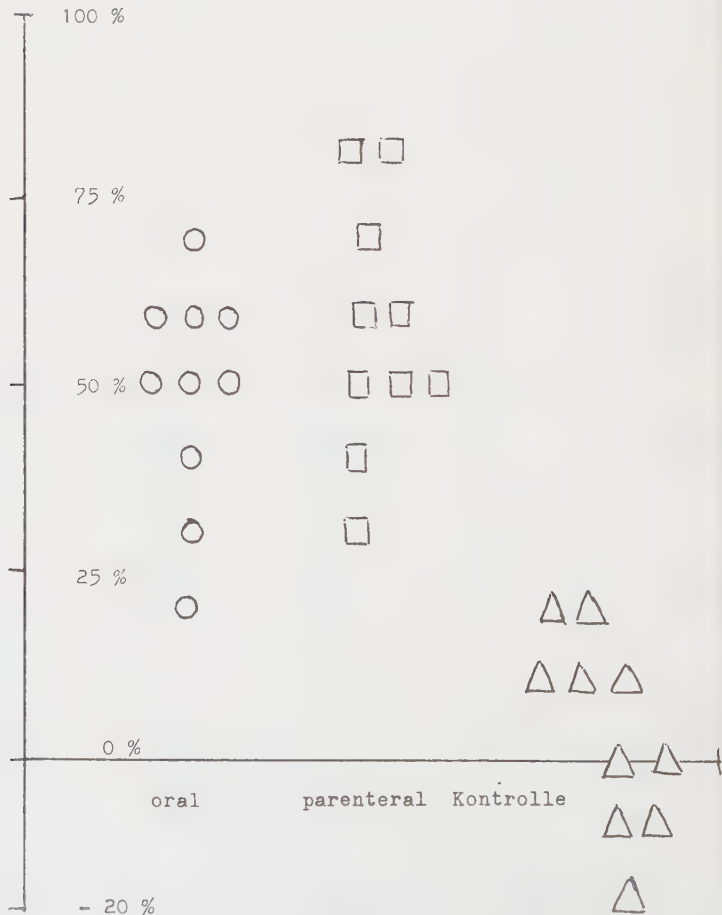
II.4. Migrationsinhibition in % für den indirekten
MHT 14 Tage nach Immunisierungsende mit
S.typhimurium.

Versuch	oral	parenteral	Kontrolle
31	60	70	
32	70	50	
33	60	30	
34	20	50	
35	50	40	vgl.
36	60	80	Werte
37	30	60	nach
38	50	60	3 Tagen
39	40	80	
40	50	50	
dMI	49	57	3

Die Verteilung der Migrationsinhibitionen,
indirekter MHT, 14-Tage-Wert.

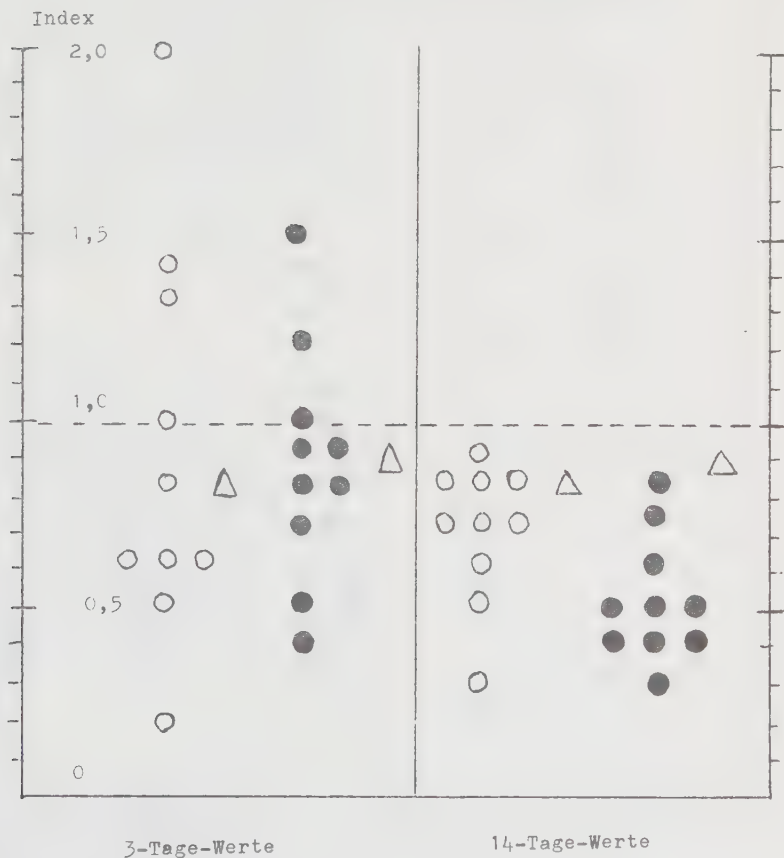
Graphische Darstellung zu II.4.

Inhibition



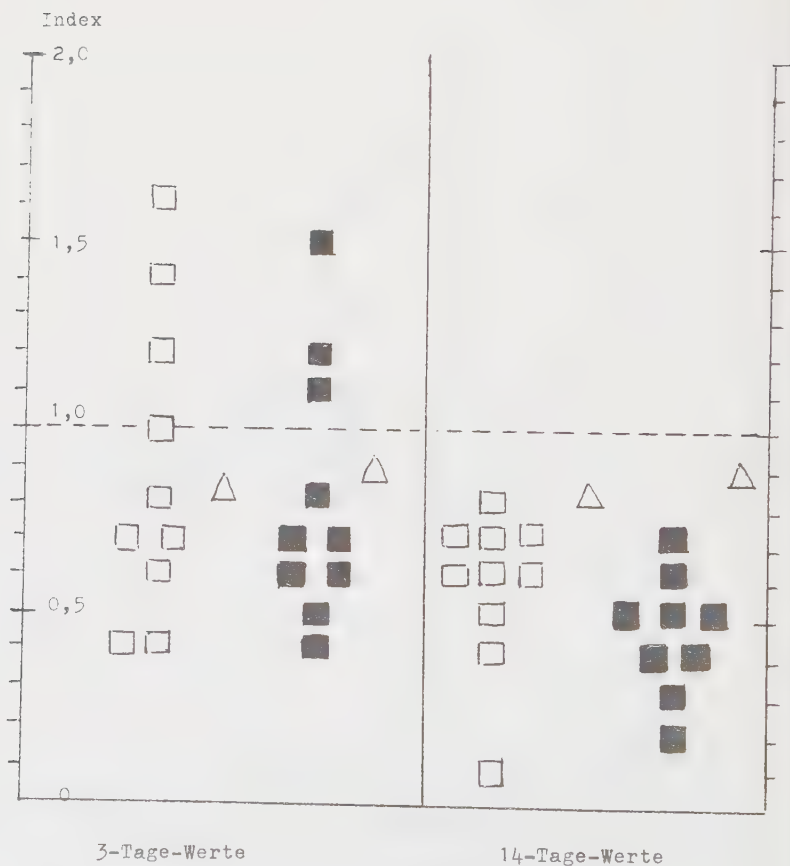
III. Die Migrationsindices der oralen und intraperitonealen Immunisierungsreihe - eine vergleichende Gegenüberstellung des direkten und indirekten MHT, der 3-Tage-Werte und 14-Tage-Werte.

1.) Die Indices der oralen Immunisierungsreihe.



- = direkter MHT
- = indirekter MHT
- △ = Kontrollindex (Durchschnittswert)

2.) Die Indices der intraperitonealen
Immunisierungsreihe.



= direkter MHT



= indirekter MHT



= Kontrollindex (Durchschnittswert)

IV. Übersicht über die durchschnittlichen
Migrationsindizes einschließlich der Streuung
für den direkten und indirekten MHT 3 bzw. 14 Tage
nach Immunisierungsende mit *S. typhimurium*.

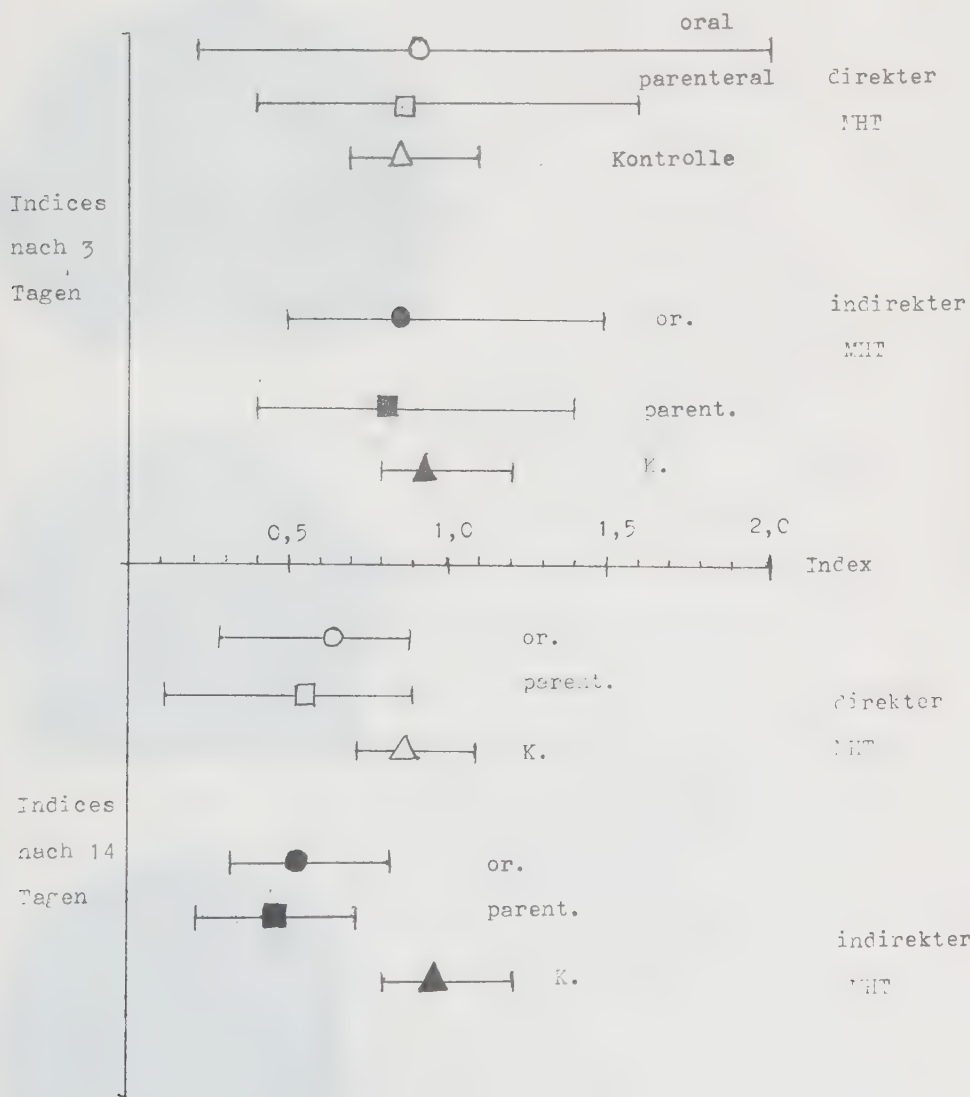


Abb.1

Migration ohne
Antigen.



Abb.2

Migration mit AG.
(Migrationsindex 0,6,
Inhibition 40 %)



Abb.3

Migration mit AG
(Migrationsindex 0,4
Inhibition 60 %)



3 Tage nach Immunisierungsende kann man auf dem Diagramm, das die Übersicht über die durchschnittlichen Migrationsindices einschließlich der Streuung darstellt, etwa gleiche Durchschnittsindices erkennen für die oralen, parenteralen und Kontrollindices beim direkten MHT. Sie alle zeigen eine geringe Inhibition von etwa 10 % an. Vergleicht man aber die Streubreite, so ist deutlich ein im Vergleich zur Kontrolle unterschiedliches Migrationsverhalten der oralen und parenteralen Reihe zu sehen. Die oralen und parenteralen Werte zeigen deutliche Hemmungen der Migration, aber auch Stimulationen. Bei den Ergebnissen des indirekten MHT 3 Tage nach Immunisierungsende sind die Werte in folgender Weise geringfügig verändert : Die Inhibition hat für die orale und parenterale Reihe im Vergleich zur Kontrolle zugenommen und beträgt 13 % für die orale und 19 % für die parenterale Immunisierung, die Kontrolle ist in ihrem Durchschnittswert zurückgegangen auf 3 % Inhibition. Neben der geringfügigen Zunahme der Inhibition für die immunisierten Reihen ist außerdem ein leichter Rückgang der Streuung bemerkbar, jedoch gibt es auch hier Stimulationen. Die Werte der Indices 14 Tage nach Immunisierungsende sind dadurch gekennzeichnet, daß die

Inhibition gegenüber den 3-Tage-Werten zugenommen hat (für die Kontrollen wurden hier wieder die 3-Tage-Werte zum Vergleich genommen) und die Streuung weiter reduziert ist. Stimulationen treten nicht mehr auf. Die durchschnittliche Inhibition beim direkten MHT zeigt jetzt einen Wert von 32 % für die orale und einen Wert von 43 % für die parenterale Reihe. Beim indirekten MHT nach 14 Tagen sind die Migrationsindices noch weiter gesunken, die durchschnittliche Inhibition also noch etwas verstärkt im Vergleich zum direkten MHT. Auch hier eine stärkere Durchschnittsinhibition für die parenterale Reihe im Vergleich zur oralen; die Werte sind konzentrierter um einen Mittelwert gelagert als beim direkten MHT. Für die orale Reihe ergibt sich eine durchschnittliche Inhibition von 49 %, für die parenterale eine Inhibition von 57 %.

IV. Diskussion

Soll der MHT als Parameter des Impferfolges nach oraler Immunisierung dienen, ist das Bestehen einer zellvermittelten Immunantwort die Voraussetzung. Bei der vorliegenden Arbeit wurde mit *S.typhimurium* immunisiert. Bezüglich der Frage der zellulären Immunantwort nach Immunisierung mit *S.typhimurium*-Bakterien gibt es unterschiedliche Meinungen. Einige Autoren machen für die Immunität vorwiegend spezifische Antikörper verantwortlich (64,121), andere nehmen überwiegend zelluläre Mechanismen an (58,61,82,93, 124,125). Besonders Mackaness, Blanden und Collins beschäftigten sich mit dieser Problematik und konnten die zentrale Bedeutung der zellvermittelten Immunantwort bei *S.typhimurium*-Infektionen aufzeigen (15, 30,31,82), nachdem zelluläre Immunität bereits bei Tuberkulose (78), bei Brucellose (60,81) und bei Listeriose (5,80) festgestellt worden war. Ein anderes Problem wirft die Frage auf, ob abgetötete Erreger von *S.typhimurium*, wie sie bei der hier unternommenen Versuchsreihe Verwendung fanden, eine ausreichende zelluläre Immunität hervorrufen, die es erlaubt, den MHT zur Messung des oralen Impferfolges anzuwenden.

Verschiedene Autoren sind der Auffassung, daß abgetötete Impfstoffe keine oder nur eine geringe Fähigkeit zur Ausbildung zellulärer Immunität besitzen (14,29), daß diese abgetöteten Impfstoffe eher humorale als zelluläre Immunantworten induzieren (22,28); und Collins bezweifelt auf Grund dieser Tatsache einen effektiven antibakteriellen Schutz durch inaktivierten Impfstoff gegen eine *S.typhimurium*-Infektion (30), da für die Eliminierung des infektiösen Agens bei solchen fakultativ intrazellulären Infektionen zelluläre Immunität unabdingbar ist. Collins berichtet, daß nicht nur die antibakterielle Immunität, sondern auch ein Korrelat der zellulären Immunantwort, die Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ, sich nur nach Impfung mit lebenden aber nicht mit toten Organismen entwickelte (27). Andere Autoren konnten die Immunität und Wirksamkeit inaktivierter Impfstoffe gegen Salmonelleninfektionen zeigen, wenn sie oral verabreicht wurden (39,41,68,105,126,148). Daß der Nachweis eines Schutzes durch inaktivierten Impfstoff gegen *S.typhimurium*-Infektionen zugleich das Auftreten von zellvermittelter Immunität bedeute wegen der dominanten Rolle der zellulären Immunität bei solchen Infektionen,

konnte mit den vorliegenden Versuchsergebnissen nachvollzogen und bestätigt werden.

Die Ergebnisse weisen zum einen prinzipiell das Auftreten von zellulärerer Immunität nach *S.typhimurium*-Immunisierung nach und bestätigen damit ihre Rolle, wie sie von den zitierten Autoren bereits dargestellt worden ist. Darüber hinaus aber beweisen sie das Auftreten einer zellulären Immunität auch nach Immunisierung mit inaktivierten *S.typhimurium*-Erregern und demonstrieren zelluläre Immunität bei inaktivierten Erregern, die sowohl auf oralem als auch auf parenteralem (i.p.) Weg verabreicht wurden. Mit der Prüfung der zellulären Immunität durch den MHT nach Immunisierung mit den inaktivierten *S.typhimurium*-Erregern auf oralem und intraperitonealem Weg wurde zugleich ein weiterer Parameter neben den in der Einleitung erwähnten Möglichkeiten zur Prüfung des Impferfolges nach lokaler, genauer oraler Immunisierung vorgeführt. Bei den Untersuchungen über die lokalen Immunsysteme, welche nach lokaler Immunisierung stimuliert werden, standen zunächst die sekretorischen Antikörper mehr im Mittelpunkt (1, 38, 120, 151, 152). Aber auch zelluläre Phänomene rückten zunehmend in den Vordergrund, Rosettenbildende Zellen

und Phagozytoseaktivität nach oraler Immunisierung wurden untersucht und hiermit neue Parameter für den Impferfolg gewonnen. Die Berichte jedoch, die sich zur Beurteilung lokaler Immunisierung mit aktivierten T-Lymphozyten durch den Nachweis des MIF mit dem MHT befassen, sind weniger zahlreich als die Arbeiten über sekretorische Antikörper. Besonders Waldman und Mitarbeiter befassten sich in ihren Arbeiten mit lokaler zellulärer Immunität nach lokaler Immunisierung, die den Respirationstrakt betreffen. Die zellvermittelte Immunantwort im Respirationstrakt wurde zunächst von Galindo und Myrvik nachgewiesen durch Lymphozyten, die aus den Lungen von BCG-immunisierten (i.v.) Mäusen gewonnen wurden (48). Hiermit wurde die These Besredkas von der Existenz lokaler Immunsysteme weiter untermauert. Yamamoto u.a. deckten den engen Zusammenhang auf, der zwischen dem Auftreten sensibilisierter Lymphozyten aus der Lunge von BCG-immunisierten Mäusen einerseits und dem Schutz gegen eine Tbc-Infektion und der Makrophagenmigrationinhibition andererseits besteht (156). Eine Korrelation in dieser Hinsicht ließen die Peritoneallymphozyten jedoch nicht erkennen. Hieraus konnten Rückschlüsse

auf die Wichtigkeit der lokalen zellulären Immunität für den Schutz gegen eine Tbc-Infektion gezogen werden, deren Eintrittspforte überwiegend der Respirationstrakt darstellt. Auch für Virusinfektionen des Respirationstraktes erkannte man die große Bedeutung lokaler zellulärer Immunabwehr, nachdem ein Infektionsschutz selbst in Abwesenheit sekretorischer Antikörper festgestellt werden konnte (6). Waldman und Mitarbeiter immunisierten zur Untersuchung lokaler zellulärer Immunität den Respirationstrakt lokal (z.B. nasal) mit Virusimpfstoffen (65,149), aber auch mit lebenden und abgetöteten Tuberkelbakterien (132). Sie fanden, daß lokale Immunisierung auf intranasalem Weg zur stärkeren Ausbildung der lokalen zellulären Immunität des Respirationstraktes führt, die parenterale Immunisierung eine intensivere generalisierte zelluläre Immunität entwickelt (56,132,147). Diese Kompartementalisierung der Immunantwort in mehr lokale oder mehr systemische Antwort je nach Immunisierungsmodus, welche aber durch erhöhte Dosen durchbrochen werden kann (13,132), wurde durch andere Autoren bestätigt (23,45,95). Während die angeführten Arbeiten sich mit der Immunisierung des Respirationstraktes

und der folgenden zellulären Immunantwort beschäftigten und darüber relativ zahlreiche Untersuchungen gemacht wurden, gibt es wenig Berichte, die sich mit der zellulären Immunität im Gastrointestinaltrakt befassen (45, 50, 51, 131, 134). Frederick immunisierte Schweine gegen ein übertragbares Gastroenteritisvirus oral und untersuchte die MIF-Produktion durch Lymphozyten aus der Lamina propria des Dünndarms und durch Milzlymphozyten (45). In beiden Immunsystemen wurde eine MIF-Produktion nachgewiesen. Beim Vergleich gleicher Lymphozytenmengen aus der Milz und der Lamina propria war die MIF-Produktion von Lamina propria-Lymphozyten bei oraler Immunisierung größer als die der Milzlymphozyten, bei subkutaner Immunisierung war die zelluläre Immunreaktion von umgekehrter Intensität. Treis immunisierte die Maus oral und parenteral mit Hammelerythrozyten und untersuchte anschließend die primäre Immunantwort an der Zunahme von rosettenbildenden Zellen (134). Nur in der Milz konnte er einen Anstieg von rosettenbildenden Zellen feststellen, nicht jedoch lokal in den Peyerschen Plaques, sowohl nach oraler wie nach intraperitonealer Immunisierung; eine Erfahrung die auch von anderen Autoren gemacht wurde (12, 138).

Schulze untersuchte ebenfalls zelluläre Phänomene nach Immunisierung des Gastrointestinaltraktes, wobei er die Zunahme der Phagozytoserate nach spezifischer wie nach heterologer Sensibilisierung zeigen konnte; d.h. Mechanismen zur Induzierung zellulärer Immunität müssen stattgefunden haben, damit die Phagozytoserate gesteigert werden konnte, selbst bei Immunisierung mit dem heterologen Antigen; ein Befund, welcher auf die außerordentliche Bedeutung zellulärer Mechanismen bei lokaler Immunisierung schließen läßt. Bei der Phagozytosemessung werden früh einsetzende, unspezifische zelluläre Mechanismen registriert, während die Messung der zellulären Immunreaktion mit dem MHT spätere, spezifische und die Makrophagen zu anderen Aktivitäten beeinflussende Mechanismen erfasst. Dies zeigt sich auch in dem verzögerten Auftreten signifikanter Migrationsinhibitionen, welche praktisch erst bei den 14-Tage-Werten zu erkennen sind. In Übereinstimmung mit den zitierten Autoren werden durch den Nachweis von Migrationsinhibitionen durch die Produkte aktivierter Lymphozyten aus dem Reservoir des Peritonealexsudats zelluläre Immunreaktionen an einem anderen Ort als an dem der Immunisierung gezeigt. Eine Kompartementalisierung in lokale

und systemische zelluläre Immunantwort wurde nicht vorgenommen. Daß die intraperitonealen Werte in geringem Maße über den oralen lagen, mag damit zu erklären sein, daß die i.p. Immunisierung eine direkte, gewissermaßen "lokale" Sensibilisierung des untersuchten lymphatischen Apparates darstellte. Um so bemerkenswerter sind die fast ebenbürtigen Migrationshemmungen aus der oralen Reihe. Andererseits hätte man bei den 3-Tage-Werten eine einheitlich tendierende, stärkere Migrationsinhibition der oralen Reihe erwarten können, ausgehend von der Annahme, die kontinuierliche Verabreichung kleiner Dosen des Impfstoffes würde auf dem Wege der Boosterung schneller zu einer eindeutigen Immunreaktion führen als die Verabreichung einer zweiten Einzeldosis unmittelbar vor Zellentnahme, wie dies bei der intraperitonealen Reihe vorgenommen wurde. Daß bis zum Auftreten signifikanter Inhibitionen ein gewisser Zeitraum benötigt wird, korreliert wiederum mit dem verzögerten Auftreten der Überempfindlichkeitsreaktionen. Berichte von Spencer und Waldman (132) von Versuchen mit lebenden und abgetöteten Tbc-Erregern zeigen außerdem, daß abgetötete Erreger erst später eine zelluläre Immunantwort anregen, bei den Tbc-Bakterien sogar erst

nach 6 Wochen. Der 3-Tage-Wert läßt trotzdem schon eine Veränderung des Migrationsverhaltens erkennen, betrachtet man die Verteilung der Einzelindices : Es treten im Vergleich zur Kontrolle Inhibitionen wie Stimulationen auf, welche sich nicht um bestimmte Werte konzentrieren. Das Auftreten von Migrationssteigerungen statt Hemmungen ist auch von Williams und Mitarbeitern bei der Untersuchung der Abstoßungsreaktion nach Lebertransplantation beobachtet worden (40) unter Verwendung peripherer Lymphozyten, außerdem von Eibl bei der Untersuchung von Reaktionen tetanustoxoidsensibilisierter Lymphozyten (43). Man nimmt an, daß zu geringe MIF-Mengen Stimulationen auslösen können. Andere Indices der 3-Tage-Werte fallen jedoch wieder durch deutliche Inhibitionen auf. Eine einheitliche Tendenz lassen erst die 14-Tage-Werte erkennen mit einer Durchschnittsinhibition von etwa 50 %, die orale Reihe etwas darunter, die parenterale (i.p.) etwas darüber. Beim Vergleich direkter MHT mit dem indirekten MHT scheint sich der bessere Antigen - Lymphozytenkontakt beim indirekten MHT in durchweg höheren Migrationinhibitionswerten niederschlagen.

Die Untersuchungen der Immunantwort nach oraler Immunisierung, der lokalen

wie der systemischen Immunantwort, der zellvermittelten wie der durch zirkulierende oder sekretorische Antikörper, der spezifischen wie der unspezifischen, zeigen, daß alle diese Reaktionen als Einheit anzusehen sind mit verschiedenem Schwergewicht, wobei nach der lokalen Stimulierung die lokale Immunantwort besonderes Gewicht hat und auch besonders deutlich ausfällt; die Bedeutung des einsatzbereiten lokalen Immunsystems liegt in seiner Funktion als erster Barriere gegen Fremddantigene und möglicherweise auch als Starter für weitere Immunreaktionen. Eine besondere Aufgabe fällt hierbei der zellulären Immunreaktion zu, der lokalen aber auch der auf andere immunkompetente Abwehrsysteme ausgebreiteten, mit ihrer ins Unspezifische reichenden Wirkung; ihre spezifischen Mechanismen wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

V. Zusammenfassung.

Im indirekten und direkten MHT wurde die Migration von Makrophagen des Peritonealexsudats oral und parenteral (i.p.) und nicht immunisierter weißer Mäuse gemessen. Als Reservoir stimulierter Zellen wurde ebenfalls das Peritonealexsudat verwendet. Der direkte und indirekte MHT wurde 3 Tage und 14 Tage nach Immunisierung mit hitze-inaktivierten *S. typhimurium*-Erregern durchgeführt. Die 3-Tage-Werte zeigten für den direkten MHT eine etwa gleiche Durchschnittsinhibition von 10 % für alle drei Versuchsserien, jedoch für die orale und parenterale Reihe ein unterschiedliches Migrationsverhalten im Vergleich zur Kontrolle, gekennzeichnet durch Inhibition und Stimulation. Der indirekte MHT brachte eine Durchschnittsinhibition von etwa 15 % für die orale und parenterale Reihe, die orale etwas darunter, die parenterale geringfügig darüber, die Kontrolle lag bei 3 %. Die 14-Tage-Werte zeigen für die immunisierten Tiere Durchschnittsinhibitionen von 40 % beim direkten und 50 % beim indirekten MHT, die oralen Werte wieder darunter, die parenteralen darüber liegend. Ebenso deutlich wie die Zunahme der Inhibition bei den 14-Tage-Werten war die Reduzierung der Streu-

breite, Stimulationen traten nicht mehr auf. Ähnliches läßt sich beim Vergleich direkter/indirekter MHT sagen: Die Inhibition der indirekten Hemmteste zeigte bei allen Versuchen höhere Werte, die Streuung war stets etwas reduziert, wenn auch nur geringfügig. Ein Vergleich der oralen mit der parenteralen Reihe läßt eine stärkere Inhibition der parenteralen (i.p.) erkennen.

Die Versuche zeigen, daß eine orale Immunisierung zelluläre Immunantwort auszulösen vermag, die der intraperitonealen ebenbürtig ist und die mit dem MHT - als weiterem Parameter zur Messung des Impferfolges neben den genannten Methoden - meßbar ist. Sie zeigen außerdem, daß inaktivierte *S. typhimurium*-Erreger meßbare zelluläre Immunität induzieren. Die Bedeutung des Migrationshemmtestes und der zellulären Immunität wird diskutiert.

VI. L i t e r a t u r a n g a b e n .

1. ABEL, W. Orale Immunisierung von Zwergschweinen mit Hammelerythrozyten und die Primärantwort immunkompetenter Zellen in Darm, Milz und Lymphknoten. Inaug. Diss., Berlin, 1974
2. AL-ASKARI, S.
LAWRENCE, H. S. In vitro studies on transplantation immunity. I. MIF production by sensitive lymphocytes in mice. Cell. Immunol. 5, 402, 1972
3. ALEXANDER, P.
EVANS, R.
GRANT, C. K. The interplay of lymphoid cells and macrophages in tumor immunity. Ann. Inst. Pasteur, 122, 645, 1972
4. AMOSA, H. E.
LACHMANN, P. J. The immunological specificity of a macrophage inhibition factor. Immunology 18, 269, 1970
5. AMSTRONG, A. S.
SWORD, C. P. Cellular resistance in listeriosis. J. Infec. Dis. 114, 258, 1964
6. BELLANTI, J. A.
SVEHAG, S.-E. Immune responses to viral antigens. A summary of Workshop 21, 1st International Congress of Immunology. In : B. Amos (ed.), Progress in Immunology. Acad. Press Inc., New York and London, 1971
7. BENACERRAF, B.
GREEN, I. Cellular hypersensitivity. Ann. Rev. Med. 20, 141, 1969
8. BESREDKA, A. Immunité générale par immunisation locale. Bull. Inst. Pasteur, 20, 473, u. 513, 1922
9. BESREDKA, A. De l'immunité locale. Bull. Inst. Pasteur, 38, 565, 1924
10. BESREDKA, A. Die lokale Immunisierung (Dtsch. Übersetzung von G. Blumenthal), Leipzig, 1926
11. BESREDKA, A. Über lokale Immunisierung. Naturwiss. 15, 395, 1927

12. BIENENSTOCK, J.
DOLEZEL, J. Peyer's Patches : Lack of specific antibody-containing cells after oral and parenteral immunization. J.Immunol.106,938,1971
13. BIENENSTOCK, J. The local immune response. Am.J.Vet.Res.,36,488,1975
14. BLANDEN, R.V.
LEFFORD, M.J.
MACKANESS, G.B. The host response to Calmette-Guerin bacillus infection in mice. J.exp.Med. 129,1079,1969
15. BLANDEN, R.V.
MACKANESS, G.B.
COLLINS, F.M. Mechanism of acquired resistance in mouse typhoid. J.exp.Med.,124,585,1966
16. BLOOM, B.R.
BENNETT, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. Science,153,80,1966
17. BLOOM, B.R.
BENNETT, B. Studies on the migration inhibitory factor associated with delayed-type hypersensitivity. Transpl. 2,996,1967
18. BLOOM, B.R.
BENNETT, B. Reactions in vivo and in vitro produced by a soluble substance associated with delayed-type hypersensitivity. Proc.Nat.Acad. Sci.,50,756,1968
19. BLOOM, B.R.
BENNETT, B. In vitro correlates of delayed hypersensitivity : Migration inhibition factor associated with delayed-type hypersensitivity. Fed.Proc.,27,13,1968
20. BLOOM, B.R. In vitro approaches to the mechanism of cell-mediated immune reactions. Adv.Immunol.,13,101,1971
21. BLOOM, B.R.
GLADE, P.R. In vitro methods in cell-mediated immunity. Acad.Press. Inc., New York, 1971

22. BOYDEN, S. V.
SUTER, W. E. Stimulating effect of tuberculin upon production of circulating antibodies in guinea pigs infected with tubercle bacilli. *J. Immunol.* 68, 577, 1952
23. CAMBRIDGE, G.
MACKENZIE, J. S.
KEAST, D. Cell-mediated immune response to influenza virus infections in mice. *Inf. Imm.*, 13, 36, 1976
24. CHASE, M. W. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, 59, 134, 1945
25. CLAUSEN, J. E. Comparison between capillary tube and agarose migration technique in the study of human peripheral blood leucocytes. *Acta allerg.*, 28, 145, 1973
26. COE, J. E.
FELDMAN, J. D.
LEE, S. Immunologic competence of thoracic duct cells - Delayed hypersensitivity. *J. exp. Med.*, 123, 267, 1966
27. COLLINS, F. M.
MACKANESS, G. B. Delayed hypersensitivity and Arthus reactivity in relation to host resistance in Salmonella-infected mice. *J. Immunol.* 101, 830, 1968
28. COLLINS, F. M. Effect of specific immune mouse serum on the growth of *Salm. enteritidis* in mice preimmunized with living or ethyl alcohol-killed vaccines. *J. Bacteriol.*, 97, 676, 1969
29. COLLINS, F. M.
MACKANESS, G. B. The relationship of delayed hypersensitivity to acquired antituberculous immunity. II. Effect of adjuvant on the allergenicity and immunogenicity of heat-killed tubercle bacilli. *Cell. Immunol.*, 1, 266, 1970

30. COLLINS, F.M. Immunity to enteric infection in mice. *Infect. Imm.*, 1, 243, 1970
31. COLLINS, F.M. Vaccines and cell-mediated immunity. *Bact. Rev. Am. Soc. Microbiol.*, 38, 371, 1974
32. COOPER, M.D.
PETERSON, R.D.A.
SOUTH, M.A.
GOOD, R.A. The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J. exp. Med.*, 123, 75, 1966
33. DAVID, J.R.
AL-ASKARI, S.
LAWRENCE, H.S.
THOMAS, L. Delayed hypersensitivity in vitro. I. The specificity of inhibition of cell migration by antigen. *J. Immunol.* 92, 264, 1964
34. DAVID, J.R. Delayed hypersensitivity in vitro : Its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 56, 72, 1966
35. DAVID, J.R. In vitro correlates of delayed hypersensitivity : Macrophage migration. *Fed. Proc.*, 27, 6, 1968
36. DAVID, J.R. Mediators produced by sensitized lymphocytes. *Fed. Proc.*, 30, 1730, 1971
37. DAVID, J.R.
DAVID, R.R. Cellular hypersensitivity and immunity. *Progr. Allergy*, 16, 300, 1972
38. DOLEZEL, J.
BIENENSTOCK, J. A and non-A immune response after oral and parenteral immunization of the hamster. *Cell. Immunol.*, 2, 458, 1971
39. DUPONT, H.L.
HORNICK, R.B.
SNYDER, M.J.
DAWKINS, A.T.
HEINER, G.G.
WOODWARD, T.E. Studies on immunity in typhoid fever; protection induced by killed oral antigens or primary infection. *Bull. W.H.O.*, 44, 667, 1971
40. EDDLESTONE, A.L.W.
SMITH, K.S.L.
MITCHELL, G.Ch.
WILLIAMS, R. Application of leucocyte migration test to the diagnosis of rejection after liver transplantation. *Transpl.*, 12, 11, 1971

49. GEORGE, M.
VAUGHAN, J. H. In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 111, 514, 1962
50. GLAISTER, J. R. Some effects of oral administration of oxazolone to mice. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 48, 828, 1973
51. GOLDBERG, S. S.
KRAFT, S. C.
PETERSON, R. D. A.
ROTHBERG, R. M. Relative absence of circulating antigen-reactive cells during oral immunization. J. Immunol., 107, 757, 1971
52. GRAHNEIS, H. Zur Senkung der Typhus-Morbidität durch perorale Schutzimpfung in Chile. Dtsch. Ges. wesen., 27, 1806, 1972
53. GRAHNEIS, H. Erste Ergebnississe einer oralen Typhusschutzimpfung mit CrovaccinR-Typhus zur Senkung der Typhus-Morbidität in Chile. Z. ges. Hyg., 18, 783, 1972
54. HAHN, H. Zelluläre antibakterielle Immunität. Zbl. Bakt. I. Orig. A 227, 184, 1974
55. HARRINGTON, J. T.
STASTNY, P. Macrophage migration from an agarose droplet. Fed. Proc. 31, 2, 3182, 1972
56. HENNEY, C. S.
WALDMAN, R. H. Cell-mediated immunity shown by lymphocytes from the respiratory tract. Science, 169, 696, 1970
57. HERBST, E. F. G. Das Lymphgefäßsystem und seine Verrichtungen. Vandenhoeck u. Ruprecht, Göttingen, 1844
58. HOBSON, D. Resistance to reinfection in experimental mouse typhoid. J. Hyg., 55, 334, 1957
59. HOFFMANN, M. Tierversuche zur Schleimhautpassage und Resorptionsvirämie von T₃-Phagen nach oraler, trachealer und rektaler Gabe. Zbl. Bakt. I. Orig., 198, 371, 1965

60. HOLLAND, J. J.
PICKETT, M. J.
A cellular basis of immunity in experimental Brucella infections. J.exp.Med., 108, 343, 1958
61. HOWARD, J. G.
Resistance to infection with Salmonella paratyphi C in mice parasitised with a relatively avirulent strain of Salm.typhimurium. Nature, 191, 87, 1961
62. HUBER, H.
FUDENBERG, H. H.
Die immunologische Funktion von Monocyten und Makrophagen. Klin.Wschr. 47. Jahrg., 204 061, 1969
63. HUGHES, D.
CASPARY, E. A.
FIELD, E. J.
Delayed hypersensitivity studies in experimental allergic encephalomyelitis : A comparison of macrophage migration inhibition test and electrophoretic mobility. Z.Immun.-Forsch., 141, 14, 1970
64. JENKIN, C. R.
ROWLEY, D.
Basis for immunity to typhoid in mice, and the question of "cellular immunity". J.Bact., 27, 391, 1963
65. JURGENSEN, P. F.
CLSEN, G. H.
JOHNSON, J. E.
E. W. SWENSON
AYOUB, E. M.
HENNEY, C. S.
WALDMAN, R. H.
Immune response of the human respiratory tract. II. Cell-mediated immunity in the lower respiratory tract to tuberculin and mumps and influenza viruses. J.Inf.Dis., 128, 730, 1973.
66. KENJO, T.
The studies of cellular immunity to gynecologic tumors with macrophage migration inhibition test. Keio J.Med., 23 (1), 1, 1974
67. LUGER, E.
Einfluß der Inhalationsimpfung auf die Phagozytosefähigkeit von Alveolarmakrophagen der Maus. Inaug.Diss., Berlin, 1975

68. KODES, I.
KODES, E.
PICH, H.
GANZE, B.
RAETIG, H.
Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 12. Mitt.: Immunogenität verschieden inaktivierter *S. typhimurium*-Vollantigene im Mäuseschutztest. Zbl. Bakt. I. Orig. 217, 242, 1971
69. KÜHNER, A. L.
DAVID, J. R.
Partial characterization of murine migration inhibitory factor (MIF). J. Immunol., 116, 140, 1976
70. KÜHNER, A. L.
REMOLD, A. G.
DAVID, J. R.
Production and characterization of mouse migration inhibitory factor (MIF). Fed. Proc. 34, 977, 1975
71. LEFÈVRE, H.
Humorale Sekundär- u. Hyperimmunreaktion nach oraler Gabe von Rinder Serumalbumin (BSA) beim Kaninchen. Inaug. Diss., Berlin, 1969
72. LEFÈVRE, H.
UECKER, W.
BLÜMEL, P.
RAETIG, H.
Untersuchungen zur oralen Immunisierung Die sekundäre Immunreaktion nach primärer oraler und nachfolgender oraler bzw. parenteraler Applikation von bovinem Serumalbumin (BSA) beim Kaninchen. Zbl. Bakt. I. Orig., 213, 548, 1970
73. LEU, R. W.
EDDLESTONE, A. L. W. F.
HADDEH, J. W.
GODD, R.
Evidence for a receptor for MIF present on the peritoneal macrophage but not on the alveolar macrophage. J. exp. Med., 136, 589, 1972
74. LEVANON, Y.
RAETIG, H.
ROSSETINI, S. M. O.
Positive immunological reaction of gut cells from orally immunized animals demonstrated by passive cutaneous anaphylaxis. Experimentia, 24, 600, 1968
75. LIETZ, B.
RAETIG, H.
Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 5. Mitt.: Tierversuche zur Schutzimpfung gegen Dyspepsiecoli-Infektionen. Zbl. Bakt. I. Orig., 204, 543, 1967

76. LIETZ, B. Orale Impfung mit inaktivierten
Dyspepsie-coli-Bakterien bei Mensch
und Tier. Inaug. Diss., Berlin, 1969
77. LUBAROFF, D. M. Cellular requirements for the
rejection of skin allografts in rats.
J. exp. Med., 138, 331, 1973
78. LURIE, M. B. Studies on the mechanism of immunity
in tuberculosis : The fate of
tubercle bacilli ingested by mono-
nuclear phagocytes derived from
normal and immunized animals.
J. exp. Med., 75, 247, 1942
79. MACKANESS, G. B. The action of drugs on the intra-
cellular tubercle bacilli.
J. Path. and Bact., 64, 429, 1952
80. MACKANESS, G. B. Cellular resistance to infection.
J. exp. Med., 116, 381, 1962
81. MACKANESS, G. B. The immunological basis of
acquired cellular resistance.
J. exp. Med., 120, 105, 1964
82. MACKANESS, G. B.
 BLANDEN, R. V.
 COLLINS, F. M. Host-parasite relations in mouse
typhoid. J. exp. Med., 124, 573, 1966
83. MACKANESS, G. B. The relationship of delayed hyper-
sensitivity to acquired cellular
resistance. Brit. Med. Bull., 23, 52, 1967
84. MACKANESS, G. B.
 BLANDEN, R. V. Cellular Immunity. Progr. Allergy,
11, 89, 1967
85. MACKANESS, G. B. The influence of immunologically
committed lymphoid cells on
macrophage activity in vivo.
J. exp. Med., 129, 273, 1969
86. MACKANESS, G. B. Delayed hypersensitivity and the
mechanism of cellular resistance to
infection. Progr. Allergy, 15, 413, 1971

87. MACANESS, J. B. Cellular immunity. Ann. Inst. Pasteur, 120, 428, 1971
88. MACKANESS, J. B. Resistance to intracellular infection. J. Inf. Dis., 122, 439, 1971
89. Mc HENCK, J. D. The mediator of cellular immunity. X. Interaction of macrophages and specifically sensitized lymphocytes. Cell. Immunol., 18, 454, 1975
90. MARQUARDSEN, A. Über die Wirkung von Kombinationsimpfstoffen aus Enterobacteriaceen am Modell der oralen Immunisierung der weißen Maus. Inaug. Diss., Berlin, 1969.
91. MARVIK, J. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 8. Mitt.: SCHMUDJE, R. Vergleichende Tierversuche zur NEUMANN-SCHÖNWETTER, B. Inhalationsimpfung und zur nasalen, RAETTIG, H. oralen und rektalen Schutzimpfung. Zbl. Bakt. I. Orig., 208, 26, 1968
92. MEVLE, R. Aufnahme und Verteilung von radio-markiertem Antigen von S. typhimurium in der Maus bei oraler, rektaler und subkutaner Anwendung. Inaug. Diss., Berlin, 1966.
93. MITSUMASU, S. Experimental salmonellosis : SATO, I. Intracellular growth of Salm. TANAKA, T. enteritidis ingested in mononuclear phagocytes and cellular basis of immunity. J. Bact., 81, 863, 1961.
94. MOCHMANN, H. Laboratoriumsversuche über die OCKLITZ, H. W. Möglichkeit einer oralen Immunisierung mit einem Natrium-desoxycholat-Extrakt aus Dyspepsiecoli-Stämmen. 3. Mitt.: Die Schutzwirkung des Extraktes im aktiven Mäuseschutzversuch. Zbl. Bakt. I. Orig. 203, 314, 1967

95. MORAG, A.
BEUTNER, K. R.
MORAG, B.
OGRA, P. L.
Development and characteristics of invitro correlates of cellular immunity to rubella virus in the systemic and mucosal sites in guinea pigs. *J. Immunol.*, 113, 1703, 1974.
96. NASH, D. R.
HOLLE, B.
Local and systemic cellular immune response in guinea pigs given antigen parenterally or directly into the lower respiratory tract. *Clin. Exp. Immunol.*, 13, 573, 1973
97. NELSON, R.
LEU, R. W.
Macrophage requirement for production of guinea pig migration inhibitory factor (MIF) in vitro. *J. Immunol.*, 114, 606, 1975
98. NEUMANN-SCHÖNWETTER, B.
Die lokale Immunisierung mit inaktiviertem Poliomyelitisvirus. *Inaug. Diss.*, Berlin, 1968
99. NOVOTNY, J. F.
HETRICK, F. M.
VIA, D.
Differentiation of four adenovirus types by macrophage migration inhibition test. *Infec. Imm.*, 10 475, 1974.
100. CHISHI, M.
ONOU, K.
Functional activation of immune lymphocytes by antigenic stimulation in cell-mediated immunity. I. Requirement for macrophages in antigen-induced MIF production by guinea pig immune lymphocytes in vitro. *Cell. Immunol.*, 18, 220, 1975
101. PIERCE, C. W.
KAPP, J. A.
WOOD, D. D.
BENACERRAF, B.
Immune response in vitro. X. Functions of macrophages. *J. Immunol.*, 112, 1181, 1974
102. PRITCHARD, G. A. V.
MOORE, L. L.
SUTHERLAND, W. H.
JCSLIN, C. A. F.
Macrophage-electrophoretic mobility (MEM)-test for malignant disease. *Lancet* 1972 II, 627

103. RAETTIG, H. Erfahrungen und vergleichende Betrachtungen über die Erfolge der parenteralen und peroralen Typhusschutzimpfung. Z. Immun.-Forsch., 108, 1950, 165
104. RAETTIG, H. Typhusimmunität und Schutzimpfung. Eine immunbiologische Studie nach den epidemiologischen Erfahrungen während der Typhuspandemie 1945/46 im Lande Mecklenburg. G. Fischer, Jena 1952.
105. RAETTIG, H. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 1. Mitt.: Der Grundversuch zur Schutzimpfung der Maus gegen eine Enteritis-Infektion. Zbl. Bakt. I. Orig., 193, 398, 1964
106. RAETTIG, H.
BUSE, A. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 4. Mitt.: Serumantikörper der Maus nach spezifischer Impfung gegen Salmonellen-Enteritis. Zbl. Bakt. I. Orig., 204, 221, 1967
107. RAETTIG, H. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 3. Mitt.: Dosierung und Impfrhythmus bei der spezifischen Impfung der Maus gegen Salmonellen-Enteritis. Zbl. Bakt. I. Orig., 203, 478, 1967
108. RAETTIG, H. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 10. Mitt.: Serologische Primär- u. Sekundärantwort nach oraler Impfung mit S. typhimurium-Vollantigen im vergleichenden Tierexperiment. Zbl. Bakt. I. Orig., 214, 216, 1970

109. RAETTIG, H.
MARQUARDSEN, A. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 11. Mitt.: Wirksamkeit von Kombinationsimpfstoffen aus Enterobakteriazeen-Vollantigen im Mäuseschutztest. Zbl. Bakt. I. Orig., 215, 296, 1970
110. RAETTIG, H.
WERNER, H. J. Plaque-Technik nach Jerne mit Darmzellen oral immunisierter Tiere. Zbl. Bakt. I. Ref., 226, 505, 1971, Münch. med. Wschr. 113, 995, 1971
111. RAETTIG, H. Aktuelle Erfolge der oralen Immunisierung. Mün. med. Wschr., 113, 671, 1971
112. RAETTIG, H. L'immunisation "locale" au moyen de microorganismes inactivés cent ans après la naissance de Besredka. Bull. Inst. Pasteur, 69, 91, 1971
113. RAETTIG, H.
LAUDAHN, G.
MÜLLING, M. Immunprophylaxe der Kälbersalmonellose durch orale Impfung mit inaktivierten Bakterien. Fortschr. d. Vet. med., Heft 17, 2. Kongr.-Bericht, 176, 1972
114. RAETTIG, H. Neue Ergebnisse zur lokalen Immunisierung insbesondere zur Impfung über die oberen Luftwege. Arzneim.-Forsch. 25, Nr. 4, 678, 1975
115. REHN, K.
BAAKE, H.
HUNSTEIN, W. Beschreibung eines vereinfachten Makrophagenmigrationshemmtestes zur Messung zellvermittelter Immunreaktionen beim Menschen. Klin. Wschr., 53, 397, 1975
116. REMOLD, H. G.
DAVID, J. R. Studies on migration inhibitory factor from concanavalin A stimulated lymphoid cells. In Proceedings of the Sixth Leucocyte Culture Conference. Edited by M. R. Schwartz. Acad. Press, New York, P. 283, 1972

117. REMOLD, H.G.
DAVID, J.R. Further studies on migration inhibitory factor (MIF) : Evidence for its glycoprotein nature. J.Immunol., 107, 1090, 1971
118. RICH, A.R.
LEWIS, M.R. The nature of allergy in tuberculosis as revealed by tissue culture studies. Bull. John Hopkins Hosp., 50, 115, 1932
119. ROCKLIN, R.E.
REMOLD, H.G.
DAVID, J.R. Characterization of human migration inhibitory factor (MIF) from antigen-stimulated lymphocytes. Cell. Immunol., 5, 436, 1972
120. ROSSETINI, S.M.C.
LEVANON, I.
RAETIG, H. Cräle Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 7. Mitt.: Nachweis von Reaginen im Serum und in Dünndarmzellen oral geimpfter Laboratoriumstiere. Zbl. Bakt. I. Orig., 208, 16, 1968
121. ROWLEY, D.
TURNER, K.J.
JENKIN, C.R. The basis for immunity to mouse typhoid. 3. Cell-bound antibody. Austr. J. exp. Biol. and Med. Sc., 42, 237, 1964
122. RUSSU, V.
NAS, L.
SUCIU, T.
DORIN, P.
ULMEANU, C. Studiul eficientei vaccinarii orale si mixte T.A.B., printestul epidemiologic. Microbiologia Parazit. Epidemiologia 5, 257, Nr. 3, 1958
123. SAHM, E. Sekretion von T₃-Phagen als Modellvirus in den Magen der Maus nach intravenöser Injektion. Inaug. Diss., Berlin, 1968
124. SAITO, K.
AKIYMA, T.
NAKANO, M.
USHIBA, D. The interaction between Salmonella enteritidis and tissue cultured macrophages derived from immunised animals. Japan J. Microbiol., 4, 395, 1960.

125. SATO, I.
TANAKA, T.
SAITO, K.
MITSUHASHI, S.
Cellular basis of immunity.
II. Inhibition of intracellular
multiplication of Salmonella
enteritidis in mouse phagocytes
of the liver and subcutaneous
tissue immunised with live vaccine.
Proc. Japan Acad., 37, 261, 1961
126. SATO, G.
Infection of Salmonella pullorum,
Salm. newington or Salm. enteritidis
in laboratory rats by oral
inoculation. Jap. Vet. Res., 13, 19, 1965
127. SCHLEWINSKI, E.
GRABEN, N.
FUNK, N.
SAHN, C.
RAETIG, H.
Orale Immunisierung mit nicht
vermehrungsfähigen Mikroorganismen
oder ihren Antigenen. 13. Mitt.:
Persorption und Sekretion von
Mikroorganismen im Tierversuch.
Zbl. Bakt. I. Orig. A, 218, 93, 1971
128. SCHLEWINSKI, E.
RAETIG, H.
LUHMER, I.
Die zelluläre Immunantwort in
Milz und Darm am Modell der direkten
Agar-Plaques-Technik nach parente-
raler und oraler Immunisierung
von Mäusen mit hitzeinaktiviertem
S. typhimurium-Antigen.
Zbl. Bakt. I. Orig. A, 224, 92, 1973
129. SCHMUDDE, R.
Vergleichende orale, nasale und
rektale Impfung von Mäusen mit
inaktivierten S. typhimurium-
Bakterien mit und ohne Dimethyl-
sulfoxyd-Zugabe. Inaug. Diss., Berlin,
1968.
130. SCHREIBER, K. A.
Ein Feldversuch zur oralen Impfung
mit inaktivierten Dyspepsie-Coli-
bakterien im Säuglings- u. Klein-
kindesalter. Inaug. Diss., Berlin, 1968
131. Schulze, H. J.
Einfluß der oralen Immunisierung
auf die Phagozytosefähigkeit von
Peritonealmakrophagen der Maus.
Inaug. Diss., Berlin, 1972.

132. SPENCER, J. C.
WALDMAN, R. H.
JOHNSON III, J. E.
Local and systemic cell-mediated immunity after immunization of guinea pigs with live or killed *M. tuberculosis* by various routes. *J. Immunol.*, 112, 1322, 1974
133. STARZYNSKI, A.
Ergebnisse der Impfungen gegen Typhus nach dem Verfahren von Besredka. *Polska gazeta lekarska*, 2, 532, 1926
134. TREIS, O.
Untersuchungen zum Rosettenphänomen in Milz und Peyerschen Plaques nach parenteraler und oraler Immunisierung der Maus mit Hammelerythrozyten. *Inaug. Diss.*, Berlin, 1975
135. TSURUMI, M.
Sur les résultats de la vaccination antityphoïdique per os. *Off. intern. d'Hyg. publ.*, 26, 1741, 1934.
136. UECKER, W.
MEVES, M.
RAETTIG, H.
Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 6. Mitt.: Tierversuche zur Resorption und Sekretion von radiomarkiertem bakteriellern Antigen. *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 208, 2, 1968
137. UNANUE, E. R.
The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. *Adv. Immunol.*, 15, 95, 1972
138. VELDKAMP, J.
VAN DER GAAG, R.
WILLERS, J. M. N.
The role of Peyer's patch cells in antibody formation. *Immunol.*, 25, 761, 1973
139. VOLKHEIMER, G.
Zur Resorption korpuskulärer Elemente durch die Darmschleimhaut und deren Ausscheidung in den Harn. *Dtsch. Gesundh. Wes.*, 16, 1610, 1961.

140. VOLKHEIMER, G. Durchlässigkeit der Darmschleimhaut für großkorpuskuläre Elemente (Herbst-Effekt). Gastroenterologie, 2, 57, 1964
141. VOLKHEIMER, G. Persorption of particles. SCHULZ, F. H. Digestion, 1, 78, 1968 b
AURICH, I.
STRAUCH, S.
BEUTHIN, K.
WENDLANDT, W.
142. VOLKHEIMER, G. Das Phänomen der Persorption von Stärkekörnern. Die Stärke, 20, 117, 1968 a.
143. WAGNER, H. T-cell mediated immune response RÖLLINGHOFF, M. induced in vitro : A probe for NOSSAL, G. J. V. allograft and tumor immunity. Transplant. Rev., 17, 3, 1974
144. WAHL, S. M. The role of macrophages in the WILTON, J. M. production of lymphokines by ROSENSTREICH, D. L. T- and B-lymphocytes. OPPENHEIM, J. J. J. Immunol., 114, 1296, 1975
145. WAKSMAN, B. H. in : Cellular and humoral aspects of hypersensitive states. Edited by Lawrence, H. S., p. 123, Harper & Brothers, New York, 1959
146. WAKSMAN, B. H. On soluble mediators of immunologic NAMBA, Y. regulation. Cell. Immunol., 21, 161, 1976
147. WALDMAN, R. H. Cell-mediated immunity and anti- HENNEY, C. S. body responses in the respiratory tract after local and systemic immunization. J. exp. Med., 134, 482, 1971
148. WALDMAN, R. H. Oral immunization of mice with GRUNSPAN, R. killed Salm. typhimurium vaccine. GANGULY, R. infec. Imm., 6, 58, 1972
149. WALDMAN, R. H. Respiratory and systemic cellular SPENCER, C. S. and humoral immune responses to JOHNSON, J. E. influenza virus vaccine administered parenterally or by nose drops. Cell. Immunol., 2, 294, 1972

150. WALDRON, J.
HORN, J.
ROSENTHAL, A.S. Antigen-induced proliferation of guinea pig lymphocytes in vitro: Obligatory role of macrophages in the recognition of antigen by immune T-lymphocytes. *J. Immunol.*, 111, 58, 1973
151. WERNER, H.J. Nachweis immunkompetenter Zellen in Darm und lymphatischen Organen der Maus nach oraler Immunisierung. Inaug. Diss., Berlin, 1971
152. WERNER, H.J.
LEVITFRE, H.
RAETTIG, H. Biphasic occurrence of IgM-forming cells in the intestine after oral immunization. *Nature*, 232, 119, 1971
153. WERNER, H.J. Die Immunreaktion nach oraler Immunisierung. Besonderheiten im Auftreten immunkompetenter Zellen. *Bund. ges. bl.*, 14, 301, 1971. *Zbl. Bakt. Ref.*, 231, 257, 1972.
154. WESSLEN, T. Passive transfer of tuberculin hypersensitivity by viable lymphocytes from the thoracic duct. *Acta tuber. scand.*, 26, 38, 1952.
155. YAMAMOTO, K.
ANACKER, R.L. Macrophage migration inhibition studies with cells from mice vaccinated with cell walls of *Mycobacterium bovis* BCG: Characterization of the experimental system. *Infec. Imm.*, 1, 587, 1970.
156. YAMAMOTO, K.
ANACKER, R.L.
RIBI, E. Macrophage migration inhibition studies with cells from mice vaccinated with cell walls of *Mycobacterium bovis* BCG: Relationship between inhibitory activity of lung cells and resistance to air-born challenge with *Mycobacterium tuberculosis* H37RV. *Infec. Imm.*, 1, 595, 1970
157. YAMAURA, N. Macrophage migration inhibition test. *Jpn. J. clin. Path.*, 22(5), 340, 1974.

Herrn Prof. Raettig danke ich für die Überlassung
des Themas und die Unterstützung bei der
Erstellung der Arbeit, den Mitarbeitern der
Abteilung für Epidemiologie im Robert Koch-Institut
sei für die liebenswürdige Hilfe beim experimentellen
Teil gedankt.

Lebenslauf.

Geboren am 8.10.47 in Kuppenheim/Bad.Württbg.,
Volksschule und altsprachliches Gymnasium in Freiburg
bis zum Abitur 1966. Anschließend Studium der Sozial-
wissenschaften an den Universitäten Freiburg und Frankfurt,
ab 1968 Studium der Medizin an den Universitäten
Heidelberg und Berlin bis zum Staatsexamen 1975.
Medizinalassistentenzeit am Städt.Krankenhaus am Urban,Berlin,
und am Robert Koch-Institut,Berlin.Z.Zt. als Assistenzarzt
auf der Chir.Abt.des Krankenhauses Paul-Gerhard-Stift,Berlin,
tätig.

